

**Økotoksikologisk karakterisering  
av to avfallsprodukter fra  
Essoraffineriet**

**Pauline Book-Bratbak**

Mastergradsoppgave i toksikologi

Program for toksikologi og økofysiologi

Biologisk institutt

Oslo, september 2005

## Forord

Denne mastergradsoppgaven er utført ved biologisk institutt, Universitetet i Oslo og ved Essoraffineriet på Slagentangen. Veiledere har vært professor Jørgen Stenersen (Universitetet i Oslo), post.doc. Line Emilie Tvedt Sverdrup (Universitetet i Oslo) og Sr. miljørådgiver Øyvind Sundberg (Essoraffineriet, Slagen, Tønsberg).

Oppgaven har vært lærerik og interessant å jobbe med, og jeg vil gjerne takke Jørgen Stenersen og Øyvind Sundberg for å ha dannet grunnlaget for et godt samarbeid, muligheten til å bli kjent med forholdene i en industribedrift samt god oppfølging underveis. Tusen takk til Line Sverdrup, som har vist stor tålmodighet og gitt gode svar på alle mine spørsmål, samt vært til uvurderlig hjelp med kulturer, metoder, vurderinger og gode tilbakemeldinger på gjennomlesing av oppgaven. Heidi Sjursen fortjener en stor takk for hjelp med kulturer når dyrene ikke har oppført seg som de skal, i tillegg til å ha vært til stor hjelp med litteratur, gjennomlesing av oppgaven samt statistisk behandling av data. Takk til Heidi Kyvik for godt samarbeid når det gjelder forståelse for de ulike prosessene og produktene ved Essoraffineriet, og takk til Hege Stubberud og Carl Einar Amundsen ved Jordforsk, for hjelp med kulturer og litteratur.

Takk til Emil og Edvard for stor tilpasningsdyktighet og gode forsøk på å være tålmodige, og takk til mormor og bestefar for utrolig mange barnevaktoppdrag! Tusen takk til Pål for stor toleranse, god støtte og hjelp til å se muligheter fremfor begrensninger.

Oslo, september 2005

Pauline Book-Bratbak

## Sammendrag

Oppgaven har vært utført i samarbeid med Essos oljeraffineri på Slagentangen utenfor Tønsberg. Blant raffineriets avfallsprodukter er det to som i kombinasjon har et høyt innhold av gjødselstoffer (nitrogen og fosfor), og som derfor har potensiale for utnyttelse som jordforbedringsmidler til skogsområdet rundt raffineriet. Hensikten med dette har vært å la de to avfallsproduktene (bioslam og elsorb) inngå i et naturlig kretsløp for å bedre vekstvilkår for vegetasjonen, samtidig som mengden lagrede masser reduseres. Denne oppgaven har hatt til hensikt å vurdere muligheten for å benytte avfallet til jordforbedring. Vurderingen er basert på en evaluering i forhold til gjeldende regelverk, fremskaffelse av nye økotoksikologiske data og en risikovurdering basert på kjemiske og økotoksikologiske data for avfallsproduktene.

En kjemisk karakterisering av de to avfallsproduktene viser at de har et relativt lavt innhold av tungmetaller og PAH-forbindelser, og at fokus for en risikovurdering derfor primært må baseres på fremskaffede økotoksikologiske data. Det er gjennomført økotoksikologisk testing på tre trofiske nivå (planter, invertebrater og bakterier). Meitemark (*Eisenia fetida*), rødkløver (*Trifolium pratense*) og engelsk raigras (*Lolium perenne*) ble eksponert for ulike blandinger med bioslam, elsorb og stedegen jord for å se på endringer i reproduksjon og vekst ved eksponering for avfallsproduktene. Microtox, en test som benytter den marine bakterien *Vibrio fischeri*, ble i tillegg anvendt for testing av bioslam og elsorb.

For at avfallet skal kunne benyttes som jordforbedring, må det, i følge retningslinjer gitt av Landbruks og matdepartementet, Miljøverndepartementet og Helsedepartementet (Norsk Lovtidend, 2003) gi en klart forbedret vekst hos planter, samtidig som skadelige effekter på invertebrater og bakterier unngås. Bioslam med elsorb gav en kraftig vekstøkning for planter (opptil 830 % for raigras og 140 % for rødkløver). Vekstøkningen var også signifikant ved innblanding av kun bioslam i stedegen jord. Lave doser bioslam med elsorb (10 % innblanding i stedegen jord) hadde ingen negativ effekt på overlevelse og vekt hos meitemark, men reproduksjonen sank med 23 %. Innblanding av 10 % bioslam med elsorb gir signifikant forbedret plantevekst, samtidig som de skadelige effektene på meitemark er små, og sannsynligvis også reversible, og det er derfor mulig at spredning av bioslam og elsorb i denne dosen relatert til jord kan være hensiktsmessig.

# Innholdsfortegnelse

1.0	Innledning.....	6
1.1	Bakgrunn .....	6
1.2	Bioslam.....	8
1.3	Behandlet bioslam .....	11
1.4	Elsorb .....	11
1.5	Testorganismer .....	12
1.6	Oppgavens formål .....	15
2.0	Materiale og metoder .....	16
2.1	Materiale.....	16
2.1.1	Beskrivelse av jord .....	16
2.1.2	Referansestoffer .....	17
2.1.3	Beskrivelse av bioslam.....	17
2.1.4	Beskrivelse av behandlet bioslam .....	18
2.1.5	Beskrivelse av elsorb.....	19
2.1.6	Bioslam med elsorb.....	20
2.1.7	Prøveopparbeidelse for testing av referansestoffer, bioslam og elsorb.....	21
2.2	Økotoksikologiske tester .....	23
2.2.1	Karakterisering av testmaterialer .....	23
2.2.2	Oversikt over gjennomførte tester.....	24
2.2.3	Tester.....	24
2.2.4	Statistikk.....	29
3.0	Resultater.....	30
3.1	Testing med referansesubstanser.....	30
3.1.1	Meitemark .....	30
3.1.2	Raigras og Rødkløver.....	31
3.2	Testing av avfallsprodukter fra Slagentangen.....	32
3.2.1	Bioslam iblandet 0,3 og 0,6% elsorb.....	32
3.2.2	Elsorb .....	37
3.2.3	Behandlet og ubehandlet bioslam .....	40
3.2.4	Oppsummering av testresultater for planter .....	42
4.0	Diskusjon.....	43

4.1	Slam som jordforbedring.....	50
5.0	Konklusjon .....	51
6.0	Referanser.....	52

## 1.0 Innledning

### 1.1 Bakgrunn

Utnyttelse av eksisterende ressurser fra industri og annen menneskelig aktivitet blir stadig viktigere ettersom mengdene med produsert avfall øker. I hvilken grad avfall og utslipp av kjemikalier har effekt på økosystemet vil variere ut fra kjemikalienes karakter og konsentrasjon. Forskjellige produkter fra industri har ofte en negativ effekt på miljøet fordi stoffer som brukes i produksjonen kan ha skadelige virkninger på organismer på ulike nivå i næringskjeden. Enkelte biprodukter har derimot et potensiale for å kunne resirkuleres eller utnyttes via gjenbruk, noe som vil være fordelaktig både for bedriften og miljøet.

Stedegen jord fra området rundt Essoraffineriet er svært skrinnet og har behov for å få tilført organisk materiale og næringssalter for å bedre vekstvilkårene for vegetasjonen. Samtidig produserer raffineriet to biprodukter (bioslam og elsorb) som følge av ulike renseprosesser, og kjemiske analyser av disse viser at de kan ha potensiale for bruk som jordforbedringsmiddel.

Bioslam stammer fra det biologiske rensetrinnet for avløpsvann, og inneholder organisk materiale som er en viktig matkilde for bakterier, sopp og jordlevende invertebrater. Dessuten inneholder det betydelige mengder makronæringsstoffer, i tillegg til noe mikronæringsstoffer. Makronæringsstoffer er grunnstoffer som trengs i store mengder (helst  $>1$  g/kg) for plantevekst, mens plantenes behov for mikronæringsstoffer er mindre. Begge biproduktene fra raffineriet (bioslam og elsorb) inneholder spesielt mye nitrogen, fosfor og svovel, som er blant makronæringsstoffene. Elsorbet stammer fra et rensetrinn for rensing av avgasser. Tester med bioslam og elsorb i kombinasjon er utført for på den ene siden å kunne observere gjødslingspotensialet av kombinasjoner av disse produktene som et jordforbedringsmiddel, og på den annen side å undersøke giftigheten av de samme blandingsene. Tester med bioslam og elsorb isolert, samt behandlet bioslam ble utført med samme målsetning.

I løpet av ett år produseres 2,5 tonn elsorb og 900 tonn bioslam. Med utgangspunkt i at alt dette blandes, får vi et blandingsforhold på 0,3 % elsorb innblandet i bioslam. Dette vil resultere i et næringsrikt bioslam som blant annet inneholder 7 g nitrogen (N), 0,3 g fosfor (P) og 0,2 g svovel (S) per kg jord (tørrvekt). I tillegg ble det valgt å utføre tester med dobbelt dose

elsorb (0,6 %) for å kunne observere eventuelle skadelige effekter på jordlevende organismer samt marine mikroorganismer.

Det finnes imidlertid et regelverk for disponering av industriavfallsprodukter som gjør at bioslam og elsorb ikke kan disponeres fritt uten ytterligere dokumentasjon. Industriavfall som har til hensikt å fungere som gjødsel må ha dokumentert effekt på vekst hos planter før det kan spres ut over grøntarealer. Samtidig skal bedriften sørge for en miljøforsvarlig forvaltning av jordsmonnet og ivareta hensynet til biologisk mangfold (Norsk Lovtidend, 2003). Høyt innhold av tungmetaller og persistente organiske miljøgifter (som PCB eller bromerte flammehemmere) ville ekskludert produktene fra gjenbruk selv om de ikke viste stor giftighet overfor jordlevende organismer, men dette har ikke vært tilfelle for bioslam og elsorb da det er dokumentert at disse produktene inneholder lave nivåer av slike miljøgifter (tilfredsstiller kravene til kvalitetsklasse III, definert i Norsk Lovtidend, 2003).

For Eссорaffineriet har det derfor vært nødvendig å sørge for at det ble foretatt undersøkelser av effekten av bioslam og elsorb før dette kunne spres. Undersøkelsene måtte være representative for området som er aktuelt for tilførsel av produktene, og de måtte inneholde flere arter og flere nivåer i næringskjeden for å gi et mest mulig representativt bilde av miljømessige konsekvenser. Dette har vært utgangspunktet for denne oppgaven, og det er foretatt en karakterisering og risikovurdering av avfall med tanke på bruk som jordforbedringsmiddel.

I en risikovurderingsprosess inngår fire hovedelementer:

1. Fareidentifisering
2. Effektvurdering
3. Eksponeringskarakterisering
4. Risikokarakterisering

Identifisering av fare innebærer å identifisere den skadelige effekten en substans har et iboende potensiale til å forårsake (van Leeuwen, 2004). For bioslam og elsorb er fareidentifiseringen basert på departementenes krav til ytterligere dokumentasjon vedrørende giftighet av industriavfallsprodukter overfor organismer (Norsk Lovtidend (2003)).

Effektvurderingen går ut på å vurdere forholdet mellom konsentrasjon av en substans (nivå på eksponering) og hyppighet og styrke på effekt (van Leeuwen, 2004). Ut fra giftighetsdata på ulike organismer, og sikkerhetsfaktorer som skal ta høyde for laboratoriedata og potensielle effekter på økosystemnivå, beregnes en PNEC (Predicted No Effect Concentration). I denne undersøkelsen er PNEC beregnet ut ifra resultatene fra de testene som er utført på produktnivå, og en tilsvarende metodikk er benyttet for å komme frem til de normverdiene som SFT har for innholdet av ulike kjemikalier i disse produktene (SFT, 1999).

Eksponering kan karakteriseres ved å måle eksponering umiddelbart når et kjemikalie er produsert eller sluppet ut. Det innebærer å kvantifisere et utslipp, og karakterisere hvordan utslippet senere spres i et medium, inkludert vurderinger rundt transformasjon og nedbrytning av utslippet. På denne måten beregnes PEC (Predicted Environmental Concentration), for å kunne si noe om hvilken konsentrasjon av en substans som er til stede i et bestemt medium til en bestemt tid (van Leeuwen, 2004). Dette er sentralt i undersøkelsen, og blir diskutert.

Risikokarakterisering er en vurdering av hyppighet og styrke på en skadelig effekt som kan oppstå i en human populasjon eller et økosystem, i forhold til eksponering for en gitt substans (van Leeuwen, 2004). Her sammenlignes miljøkonsentrasjonen (PEC) med de nivåer hvor man ikke forventer miljøeffekter (PNEC), og kun dersom PEC overstiger PNEC ( $PEC/PNEC > 1$ ) anses det å være en fare for negative effekter på miljøet.

## **1.2 Bioslam**

Bioslam er et biprodukt som dannes etter biologisk rensing av avløpsvann ved raffineriet, som er siste trinn i renseprosessen. Rensingen av avløpsvann foregår over tre trinn. I første trinn skjer rensingen mekanisk ved at oljefasen skummes av fra vannfasen. Ytterligere rensing skjer i et flotasjonsanlegg (DAF), ved hjelp av flokkulering og flotasjon. Vannfasen som er igjen etter at flokkulering og flotasjon er gjennomført, renses videre ved hjelp av biologisk aktivitet. Her reduseres vannets innhold av olje, fenoler, ammoniakk og sulfider ved hjelp av bakteriell nedbrytning (Esso, 2000).

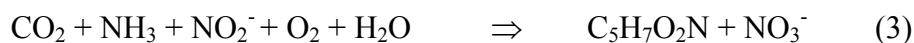
Det biologiske renseanlegget består av to soner; en aerob nitrifiseringssone (N-sone) og en anaerob denitrifiseringssone (DN-sone). Bakteriene i den aerobe N-sonen omdanner organisk



karbon til vann og karbondioksid (CO<sub>2</sub>). BOD (Biological Oxygen Demand) betegner det karbonet som er biologisk tilgjengelig for nedbrytning.

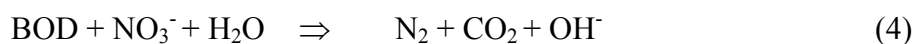


Bakteriene kan formere seg ved å benytte karbondioksid som byggemateriell og danne sitt eget cellemateriale, C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N. I disse reaksjonene er det imidlertid behov for en viss mengde nitrogen i form av ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) eller ammoniakk (NH<sub>3</sub>). Dette kommer frem i likning 2 og 3.

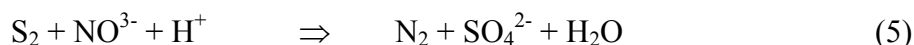


Ammonium og ammoniakk reduseres til nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) og nitritt (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ved reaksjon med karbondioksid, oksygen og vann. Samtidig danner bakteriene nytt cellemateriale mens vann og H<sup>+</sup> frigis (2). Som det fremgår av likningene er bakteriene som setter i gang disse reaksjonene aerobe, da de er avhengige av tilgang til oksygen.

I DN-sonen tilsettes ikke oksygen, og de aktive bakteriene her benytter derfor nitrat eller nitritt som oksygenkilde.



I DN-sonen vil også bakterier omdanne sulfid (S<sub>2</sub>) til sulfat (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) samtidig som nitrat reduseres til nitrogen.



Etter reaksjonene i DN-sonen er nitraten fra N-sonen (ammoniakk) omdannet til nitrogen (N<sub>2</sub>). For øvrig dannes hovedproduktene vann (H<sub>2</sub>O), karbondioksid (CO<sub>2</sub>), sulfat (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) og biologisk slam.

Tilsetning av luft i N-sonen, og ikke i DN-sonen, fører til en forskjell i tetthet mellom de to sonene. Dette gir opphav til en sirkulasjon, som fører oksygenkildene nitrat og nitritt fra N-sonen til den oksygenfattige DN-sonen. For optimal drift av det biologiske rensetrinnet tilsettes også fosfor, og pH blir regulert i området 7-8.

Sedimentert slam sendes til en slamtank via et hevertsystem, og mesteparten av dette returneres til DN-sonen i Biox-bassenget. Overskuddet, som inneholder mer enn 90 % vann, tas ut og spres over avgrensede områder i åpent terreng inne på raffineriets område. Store deler av vannet fordampes, og slammet flyttes deretter til et større område der det oppbevares. Det er dette slammet som er brukt i denne undersøkelsen.

Bioslammets sammensetning vil variere avhengig av sammensetningen på råoljen som er kommet inn til raffineriet, og det er derfor vanskelig å få en representativ karakterisering av slammet ved å analysere enkeltprøver. Typiske forurensninger i slammet er imidlertid hydrokarboner, herunder polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) og noe tungmetaller.

Selv om råolje inneholder noe aromatiske forbindelser, stammer PAH-forbindelsene i slammet i hovedsak fra raffineringsprosessen, hvor de dannes når alkaner varmes opp til 500 °C under høyt trykk. PAH'er finnes i over 100 ulike varianter, og betraktes gjerne som en felles gruppe. PAH-forbindelser er bygget opp av 2 til 7 benzenringer, og har en *n*-oktanol-vann fordelingskoeffisienten (log Kow) som øker med molekylmasse, og er i området 3.0 til 7.0. Dette innebærer at PAH med mange benzenringer har lav vannløselighet, og generelt har forbindelsene lav til svært lav vannløselighet (Sverdrup, 2001). Forbindelsene bindes sterkt til jord og sedimenter.

Halveringstiden for PAH-forbindelser i akvatisk miljø er fra en uke til to måneder. I jord er halveringstiden fra to måneder til to år, mens den i sedimenter ligger mellom 8 måneder og 6 år (Mackay et al. 1992). På grunn av høy giftighet og til dels lav nedbrytbarhet regnes utslipp av PAH-forbindelser som et miljøproblem.

### **1.3 Behandlet bioslam**

Behandlet bioslam er i praksis utråtnet slam, som følge av anaerob nedbrytning. Når slammet er utråtnet innebærer det at forbindelsene som har vært tilstede er fullstendig nedbrutt, noe som gir et lavere slamvolum, mindre luktproblemer og høyere gjødselverdi. Prosessen bygger på at anaerobe bakterier har evnen til å redusere bionedbrytbare forbindelser til metan ( $\text{CH}_4$ ) og karbondioksid ( $\text{CO}_2$ ), og denne blandingen kalles biogass. Den anaerobe omdanningen foregår over tre trinn, som inkluderer hydrolyse, syreproduksjon og metanproduksjon. I hydrolysefasen blir sammensatt og uoppløst organisk materiale (proteiner, fett og karbohydrater) løst opp og omdannet til enklere og mer vannløselige forbindelser, som aminosyrer, fettsyrer og sukker. Syreprodusende bakterier vil ta opp de oppløste organiske stoffene og bryte dem ned til mindre og mer flyktige forbindelser. I siste trinn omdanner metanogene bakterier eddiksyre til metan og karbondioksid. Biologisk sett er metanproduksjonen den hastighetsbegrensende reaksjonen. Etter nedbrytningsprosessen blir det igjen et restprodukt av uorganisk materiale og tyngre nedbrytbare organiske stoffer (biorest).

Utråtning av bioslam er en prosess som er under utvikling på Slagentangen. Målet er å bryte ned forbindelsene i slammet i så stor grad som mulig, i tillegg til å redusere et lukt- og mengdeproblem. I denne mastergradsoppgaven er det også gjort enkelte giftighetstester av behandlet (utråtnet) bioslam. Dette bioslammet ble tatt fra en småskalabehandling, utført ved Essoraffineriet, som involverte at en egen kultur med anaerobe bakterier ble tilsatt bioslam i en lukket reaktor. Bioslammet inneholdt aerobe bakterier, og de anaerobe bakteriene brøt ned aerobe bakteriene ved beiting. Vann som var bundet opp i celleveggen hos de aerobe bakteriene ble dermed frigjort. Bioresten forventes å ha et liknende innhold av forurensninger som det opprinnelige slammet.

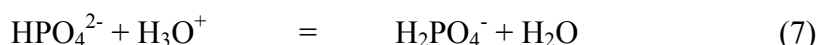
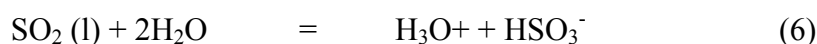
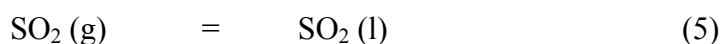
### **1.4 Elsorb**

Elsorb er et biprodukt som har blitt dannet ved utprøving av et nytt system for absorpsjon og gjenvinning av svovelgass. Prosessen deles inn i tre trinn:

- Absorpsjon av  $\text{SO}_2$  i vandig bufferløsning
- Avdriving av  $\text{SO}_2$  ved inndamping
- Konvertering av  $\text{SO}_2$  til salgbart produkt

Prosessen er basert på bruk av en fosfatbuffer for absorpsjon av SO<sub>2</sub> fra røykgass. Bufferen er en blanding av fosforsyre og natriumhydroksid, og systemet arbeider i pH mellom 5,5 og 6,5. Det relativt høye pH-området gir en høy rensegrad, og dette kombinert med bufferens store evne til å ta opp SO<sub>2</sub> gir høy rensegrad med liten væskemengde (Esso, 1991)..

Absorpsjonen skjer i den kjemisk stabile fosfatbufferen, og hovedreaksjonene er:



I en etterfølgende inndampingsprosess dampes SO<sub>2</sub> og vann av, og noe SO<sub>2</sub> skal ideelt sett tas ut som gjenvunnet produkt og omdannes til salgbart produkt.

2 – 3 % av volumstrømmen som går til absorpsjon blir tatt ut for fjerning av natriumsulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Til dette er det utviklet en egen metode, der sidestrømmen inndampes og filtreres. Filterkaken løses opp med vann, og en ny filtrering gir selektiv utfelling av Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Bufferkjemikalier som ikke følger med filtratet blir sendt tilbake til prosessen, mens Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> er et biprodukt som må deponeres. Dette er elsorb-produktet som er benyttet i testene i denne undersøkelsen.

Biproduktet fra elsorb-prosessen (heretter kalt elsorb) har et svært høyt innhold av natriumsulfat, og det var derfor forventet at effekter på jordlevende organismer delvis ville kunne tilskrives en salteffekt (forhøyet ledningsevne i porevannet i jorden).

## **1.5 Testorganismer**

Det er valgt ut testorganismer fra tre trofiske nivå for å få et representativt innblikk i hvordan spredning av bioslam og elsorb vil påvirke økosystemet. Dette inkluderer i denne undersøkelsen jordlevende invertebrater, planter og bakterier.

## Invertebrater

Jordlevende invertebrater har høy følsomhet overfor forurensninger i jord, fordi de har en anatomi og et levesett som gjør dem mottagelige for forskjellige stoffer i jorden. De har en myk, permeabel ytre hud der stoffer i porevannet i jorden lett tas opp, i tillegg til at stoffer som kommer inn i fordøyelsessystemet via mat tas opp i tarm. Respirasjon skjer over kroppsoverflaten, noe som kan føre til at forurensende stoffer kan komme inn i dyret via gassutveksling. De jordlevende invertebratene fyller også en viktig rolle i det terrestre økosystemet, ved at de bidrar til effektiv nedbryting av organisk materiale. Meitemark står for en stor del av den luftingen og blandingen av jorden som er nødvendig for å opprettholde struktur og næringsinnhold i jordlaget, i tillegg til å inngå som en viktig del av dietten til fugler, reptiler og små pattedyr. Mindre mark og insekter er del av dietten til annen jordlevende biota, og denne dyregruppen er derfor en viktig del av den terrestre næringskjeden. På grunn av disse egenskapene og karakteristikaene anses enkelte jordlevende invertebrater å være gode økologiske indikatororganismer (Peijnenburg et. al, 1999).

For å få et helhetlig bilde av hvordan teststoffene ville påvirke jordlevende organismer var det ønskelig å benytte flere arter i undersøkelsen. Jeg ønsket i utgangspunktet å benytte tre arter jordlevende invertebrater i undersøkelsene: En art av meitemark (*Eisenia fetida*), en spretthale (*Folsomia candida*) og en enchytraeide (*Enchytraeus crypticus*). Problemer med kulturrene gjorde imidlertid at jeg til slutt måtte basere meg hovedsakelig på bruk av meitemark.

Meitemark er en betegnelse på en hel familie av leddormer (Lumbricidae). Det naturlige habitatet for arten *E. fetida* er blant annet møkkhauger og kompost, men dyrene er tilpasningsdyktige og tåler store forandringer. De er derfor mye brukt i kultur. Markene er middels store, de er sjelden lengre enn 10 cm, og kan veie rundt 1 g. De er lette å skille fra andre arter, ved at de har rød-gule striper på kroppen. *E. fetida* er enkle å kultivere i romtemperatur, men har visse krav til levevilkår for at de skal trives. Oksygeninnholdet ( $O_2$ ) må være høyere enn 15%, og karbondioksidnivået ( $CO_2$ ) lavere enn 6%. Dyrene foretrekker nøytralt substrat, og  $pH < 5$  eller  $> 9$  er dødelig. Total saltkonsentrasjon må ikke overgå 0,5%. Meitemarken trenger fôr som består av proteiner, karbohydrat og fett i tillegg til mikroorganismer, sopp (fungi) og protozoa, for å oppnå vektøkning og reproducere seg. Maten bør plasseres oppå substratet, da dyrene kan dø dersom næringsstoffene blandes inn i substratet (Astrid Lofs-Holmin, 1985). *E. fetida* legger i løpet av fire uker kokonger som kan inneholde opptil flere juvenile, og arten har derfor en høy reproduksjonskapasitet.

Spretthaler hører til leddyrene (Arthropoda), de har seks ben men skiller seg fra insektene ved at de har indre kje ver (Entognatha). Individuer av arten *F. candida* er blinde og parthogenetiske (hanner er ikke funnet), og de lever i det øverste jordlaget i jorden. Dyrene reproducerer seg lett, og har vid toleranse overfor endringer i pH. Vanligvis er de voksne dyrene ca 0,5 cm lange.

Enchytraeidae er en familie innenfor leddormene (Annelida). *E. crypticus* lever i det øverste jordlaget der de bidrar til   bryte ned organisk materiale. Voksne dyr kan bli opp til ca 1 cm lange.

## **Planter**

I liket med andre arter som skaper vegetasjon, tar de høyerestående plantene opp ulike stoffer via sitt rotsystem fra porevannet i jorden. De spres via plantens sirkulasjonssystem og har effekt på ulike cellulære mekanismer. H yerest ende planter er derfor nyttige indikatororganismer for   se effekt av både forurensende stoffer og stoffer med gjødseffekt, på vegetasjon. Plantene som er valgt ut som testorganismer er arter som har vid utbredelse, spesielt på eng, og er vanlige i området rundt Essoraffineriet, der det ville være aktuelt   spre bioslam og elsorb som gjødsel. Det er valgt ut en enfr bladet og en tofr bladet art for i størst mulig grad   få et representativt bilde av den stedegne vegetasjonens effekt av de to produktene (bioslam og elsorb), samtidig som dette er anbefalt i ISO sitt testoppsett.

Engelsk raigras (*Lolium perenne*) er en enfr bladet gressart som er mye brukt som testorganisme. Arten er utbredt i store deler av verden. De enfr bladede plantene dominerer blant angiospermene (blomstrende planter), og kan i mange tilfeller kjennetegnes ved enkle blader med langsgående  rer på smale blader. Rødkløver (*Trifolium pratense*) er en tofr bladet plante som vokser naturlig på eng, og er utbredt i store deler av verden. Den er del av angiospermene, og blomsterkronen er ofte r d eller rosa. Bladene er tredelt. Planten er vanlig i bruk på plener og blomstereng, og er godt egnet som f r til kyr.

## **Bakterier**

Det ble bestemt   teste bioslam og elsorb på bakterier brukt i Microtox-testen fordi dette ville si noe om effekten ved eventuell avrenning eller utlekking til marint miljø. Bakteriene som brukes i Microtox er *Vibrio fischeri*, fra stammen B-11777. De er luminiserende (lysproduserende) og halofile (krever en saltkonsentrasjon på minst 0,2M). Bioluminescens er

biologisk lys som sendes ut fra organismer. Hos B-11777 dannes lys under bakterienes respirasjon, nærmere bestemt ved reaksjonen mellom ATP, luciferin og oksygen. Ved hjelp av enzymet luciferase oksideres luciferin til den energirike men ustabile forbindelsen oksyluciferin, som raskt omgjøres til luciferin igjen samtidig som energioverskuddet frigjøres som lys.

I Microtox-testen ble kalsiumnitrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) benyttet som ekstraherende agent, for at testsubstratet skulle foreligge i løsning med tilsvarende innhold av forurensende stoffer, som det som var tilstede i bioslammet og elsorb. Tidligere undersøkelser har vist at kalsiumnitrat har potensiale til å fungere som ekstraherende agent fordi det ikke er toksisk overfor testorganismene, det er enkelt å lage til og enkelt å bruke, samtidig som det kan benyttes en lav løsning-til-jord ratio og det er mulig å oppnå samme ionestyrke som i jordløsningen (van Gestel et al, 2000).

## **1.6 Oppgavens formål**

Hensikten med oppgaven var å gjøre en økotoksikologisk karakterisering av bioslam og elsorb, med påfølgende risikovurdering for bruk av avfallsproduktene til jordforbedring. Følgende hypoteser er derfor satt opp:

1. Hvert enkelt avfallsprodukt har en gjødselverdi og kan derfor karakteriseres som en ressurs med potensiale for gjenbruk.
2. Hvert enkelt avfallsprodukt inneholder forurensninger som i en viss konsentrasjon har negativ effekt på jordlevende organismer.
3. Innblanding av lave konsentrasjoner av avfallsproduktene i stedegen Slagentangenjord vil gi økt plantevekst samtidig som negative effekter på andre jordlevende organismer unngås.

## **2.0 Materiale og metoder**

### **2.1 Materiale**

#### **2.1.1 Beskrivelse av jord**

##### **OECD-jord**

Jorden er opparbeidet i henhold til OECD Test Guideline 207 (OECD, 1984) og ISO 11268-2 (ISO, 1998), og består av følgende komponenter basert på tørrvekt:

10 % torv

20 % kaolin leire

Ca 69 % kvartsand (avhengig av nødvendig mengde  $\text{CaCO}_3$ ), fortrinnsvis med mer enn 50 % innhold av partikler med størrelse fra 0,05 mm til 0,2 mm. Fra 0,3% til 1,0%  $\text{CaCO}_3$  er tilsatt for å få pH på  $6,0 \pm 0,5$ .

Jorden ble blandet opp med tørre bestanddeler, og pH ble justert. pH ble også kontrollert kort tid før jorden skulle brukes.

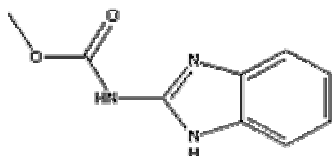
##### **Stedegen jord**

Stedegen jord fra to ulike lokaliteter rundt skogsområdet utenfor Essoraffineriet, er benyttet til testene. Henting av jord har vært utført med minigraver, fra områder som raffineriet har valgt ut. Jord ble første gang hentet fra en lokalitet i nærheten av Blikstadkilen, som ligger på vestsiden av raffineriet, 11.03.2004. Siste gang jord ble hentet ut var 23.08.2004, og denne jorden kom fra en sandholdig komposthaug som er plassert syd for selve raffinerområdet. Felles for jordtypene er at de er fattige på næringsstoffer, og inneholder en kombinasjon av skogsjord blandet med grus og sand. All jord som er benyttet i testene er tørket på  $80^\circ\text{C}$  i ett døgn, og deretter silt i jordsikt med maskevidde 2,5 mm.



### 2.1.2 Referansestoffer

Karbendazim er et soppmiddel som benyttes for å bekjempe soppangrep på avlinger. Forbindelsen tilhører gruppen benzimidazoler, har molekylvekt (MW) på 191,2 og lav løselighet i vann (<0,1 g / 100mL). Karbendazim anbefales av ISO som referansestoff for tester med meitemark (*E. fetida*) og enchytraeider (*E. crypticus*), og er i denne undersøkelsen også forsøkt testet på spretthaler (*F. candida*). Karbendazim som er benyttet er kjøpt fra Sigma-Aldrich (Oslo, Norge).



Figur 2.1. Strukturformel av karbendazim.

Natriumtrikloracetat (NaTA) er en forbindelse som er løselig i vann ( $\geq 10$  g/100 mL), og er i henhold til standarden anbefalt som referansestoff for å undersøke likheten mellom forskjellige laboratorier som benytter planter som testorganisme. Forbindelsen er derfor benyttet til dette formålet i denne undersøkelsen. Natriumtrikloracetat (NaTA) som er benyttet er kjøpt fra Sigma-Aldrich (Oslo, Norge).

### 2.1.3 Beskrivelse av bioslam

Innholdet i bioslam varierer ut fra egenskapene ved råoljen som kommer inn til raffineriet, og tre kjemiske analyser er foretatt (tabell 2.1). Bioslam som er benyttet i testene er tatt ut fra slamtanken i oktober 2003. Deretter har det ligget i åpent terreng inne på raffineriområdet til fordamping, for så å bli plassert til oppbevaring. Slammet er hentet ut herfra 11.03.04, og har ligget på kjølerom ved 4 °C frem til det ble tørket ved en relativt lav temperatur (40°C i tre døgn) for å redusere vanninnhold og samtidig unngå fordamping av potensielt toksiske forbindelser. Bioslammet inneholdt en del stein, og det var derfor nødvendig å bruke sikt for å få en rimelig homogen størrelsesfordeling på partiklene. Sikten ga et substrat med partikkelstørrelse mindre enn 2,5 mm.

**Tabell 2.1. Analyseresultater av innhold i bioslam. Alle verdier er oppgitt i mg/kg tørrstoff.**

Analyse	10. 2001 Jordforsk	11.05 2004 Analytica	09.10 2004 LabNett
<b>Olje (THC)</b>	7.600	1.230	11.000
<b>ΣPAH</b>	4,4	---	6,7
<b>Arsen (As)</b>	---	2,8	2,7
<b>Kadmium (Cd)</b>	<2	0,1	5,3
<b>Kobolt (Co)</b>	---	3,6	---
<b>Krom (Cr)</b>	19	10,3	---
<b>Kobber (Cu)</b>	52	4,9	28
<b>Kvikksølv (Hg)</b>	0,7	0,2	0,7
<b>Nikkel (Ni)</b>	25	10,0	44
<b>Bly (Pb)</b>	86	5,2	22
<b>Vanadium (V)</b>	---	13,4	---
<b>Sink (Zn)</b>	453	82,0	692
<b>Nitrogen (N)</b>	13,382*	---	---
<b>Fosfor (P)</b>	3.960	5.230	---
<b>Svovel (S)</b>	---	1.630	---

\* Totalt nitrogen i form av nitrat + nitritt, Kjeldal-N og Ammonium-N

#### **2.1.4 Beskrivelse av behandlet bioslam**

Egenskaper hos bioresten (behandlet slam ved utråtning) bestemmes av hva slags materiale som er utråtnet, samt hvilke prosesser avfallet har gjennomgått. Gjennom selve utråtningsprosessen vil i prinsippet tilnærmet all næring i det opprinnelige avfallet beholdes i produktet, men dette kan være tilstede i vannfasen eller faststoffet. Selve utråtningsprosessen reduserer innholdet av organisk stoff og tørrstoffinnhold, samtidig som mye av nitrogenet omdannes fra organisk bundet nitrogen til ammonium. Dette kan tas opp av planter. I mange tilfeller kan derfor utråtning øke gjødselverdien av materialet som behandles. Eventuell lagring, avvanning eller videre kompostering vil kunne føre til at mye av ammoniumet forsvinner fra produktet. Gjødselverdien vil da reduseres vesentlig (Bøen et al, 2005). Raffineriet har foreløpig ikke utført analyser av bioresten.

### 2.1.5 Beskrivelse av elsorb

Biproduktet fra elsorb-prosessen (elsorb) inneholder spesielt mye natrium, fosfor og svovel, i tillegg til enkelte mikro- og makronæringsstoffer for planter samt små mengder tungmetaller (tabell 2.2). Forbindelsene som dominerer er natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) og natriumhydrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Innholdet av vann er ca 15 %.

*Tabell 2.2 Analyseresultater av innhold i elsorb. Alle verdier er oppgitt i mg/kg tørrstoff.*

Analyse	11.05 2004, Analytica
Natrium (Na)	165.000
Fosfor (P)	71.800
Svovel (S)	47.100
Nitrogen (N)	---
Kalsium (Ca)	35,4
Kalium (K)	<50
Magnesium (Mg)	9,3
Jern (Fe)	31,5
Sink (Zn)	2,3
Bor (B)	9,9
Kobber (Cu)	<1
Mangan (Mn)	0,5
Molybden (Mo)	1,6
Aluminium (Al)	6,9
Arsen (As)	<1
Kadmium (Cd)	<0,1
Kvikksølv (Hg)	<0,02
Nikkel (Ni)	3,4
Bly (Pb)	<0,5

Det høye nivået av ioner fører til at saliniteten i jord tilsatt elsorb blir svært høy, og denne har derfor blitt målt og sammenlignet med løsninger med natriumklorid ( $\text{NaCl}$ ), da det er sannsynlig at høyt innhold av salter har en negativ innvirkning på terrestre organismer (tabell 2.3). Saliniteten er målt som spesifikk konduktivitet. Dette tilsvarer den spesifikke motstanden mellom to elektroder i en omkrets på  $1\text{ cm}^2$  og 1 cm fra hverandre, i en løsning,

og er et mål på vannets evne til å lede elektrisitet (ledningsevne). Konduktiviteten blir høyere med høyere konsentrasjon av oppløste stoffer i vannet, og måles i milliSiemens  $\text{cm}^{-1}$  (mS/cm). Generelt anses spesifikk konduktivitet å være et representativt mål på konsentrasjonen av totale oppløste stoffer (TDS) og salinitet.

**Tabell 2.3. Ledningsevne (mS/cm) i løsning med natriumklorid (NaCl) og elsorb.**

<b>% NaCl</b>	<b>Ledningsevne, mS/cm</b>	<b>% elsorb</b>	<b>Ledningsevne, mS/cm</b>
<b>0</b>	0,46	<b>0</b>	0,46
<b>0,5</b>	0,87	<b>0,3</b>	1,29
<b>2</b>	3,32	<b>0,6</b>	3,77
<b>4</b>	6,22	<b>2</b>	4,11
<b>10</b>	14,55	<b>10</b>	24,88

### 2.1.6 Bioslam med elsorb

pH og ledningsevne ble kontrollert i tilfeldig valgte replikater ved avslutning av test med meitemark eksponert for bioslam med elsorb, for å kunne observere en eventuell endring. pH ble målt til å være mellom 6.5 og 8.0, mens ledningsevnen økte relatert til konsentrasjon bioslam med elsorb.

**Tabell 2.4. Ledningsevne og pH (gjennomsnitt av serie med 0,3 og 0,6% elsorb) i jord tilsatt bioslam med elsorb.**

<b>Konsentrasjon</b>	<b>pH</b>	<b>Ledningsevne (mS/cm)</b>
<b>0</b>	7,6	0,44
<b>10</b>	7,0	1,51
<b>25</b>	6,5	2,31
<b>50</b>	7,1	3,10
<b>100</b>	8,0	3,36

## **2.1.7 Prøveopparbeidelse for testing av referansestoffer, bioslam og elsorb**

### **Referansestoffer**

Bestanddelene i OECD-jorden (torv, kaolinleire og kvartssand) ble veid opp hver for seg i tørrvekt, etter mengdeforhold beskrevet i 2.1.1. De ble blandet manuelt, og pH ble justert til  $6.0 \pm 0.5$ . Referansestoffenes løselighet i vann er svært ulik, og prøveopparbeidelsen av disse måtte derfor skje ved bruk av forskjellige metoder. NaTA er løselig i vann, og kunne blandes direkte inn i tørr OECD-jord før vann ble tilsatt. Karbendazim har svært lav løselighet i vann, og stoffet måtte derfor løses i aceton før det ble blandet inn i OECD-jord i ulike konsentrasjoner. Opparbeidelse av hver dose ble utført ved å lage en konsentrasjonsrekke der en stamløsning med karbendazim og aceton ble fortynnet til de konsentrasjonene som skulle testes. For testing på spretthaler og enchytraeider ble utregning av konsentrasjon i stamløsningen gjort på følgende måte:

$$X \text{ mg/L} = 1 \text{ kg}/0,2 \text{ L} * 32 \text{ mg}/1\text{kg} = 160 \text{ mg/L}$$

Dette fordi aceton inneholdende karbendazim ble tilsatt tilsvarende 20% av jordens tørrvekt.

I testing med meitemark er høyeste testkonsentrasjon 8 mg karbendazim/kg jord (tørrvekt), og konsentrasjonen i stamløsningen er derfor 40 mg karbendazim/L aceton.

Løsningene med hver enkelt testkonsentrasjon ble blandet inn i OECD-jord og satt til å fordampe under avtrekkskap i ett døgn. Vann tilsvarende 20 % av jordens tørrvekt ble deretter tilsatt før prøvene ble fordelt på fire replikater i hver dose. Det ble benyttet kontroll (avdampet aceton, vann og OECD-jord) og vannkontroll (vann og OECD-jord) for å ha mulighet til å oppdage en effekt av eventuelle rester av aceton, på testorganismene.

### **Bioslam med elsorb**

Bioslam og jord ble veid opp i tørrvekt hver for seg, på vekt som viste  $\pm 0,5$  g. Elsorb ble finmost i mørtel, og mengde tilsvarende 0,3 og 0,6% av mengde bioslam i hver konsentrasjon ble veid opp på finvekt. Elsorb ble manuelt blandet inn i tørt bioslam, og fordelt godt. Blandingen med elsorb og bioslam ble blandet manuelt inn i tørr jord, og fordelt godt. Vann ble deretter tilsatt, og blandinger fordelt på fire replikater i hver dose. Testorganismer ble tilsatt.

### **Bioslam og elsorb isolert**

I testene der bioslam og elsorb er testet hver for seg ble teststoffene veid opp i tørrvekt, og deretter tilsatt stedegen jord (tørrvekt). De ble blandet inn manuelt før vann ble tilsatt, og fordelt på fire replikater i hver dose. Testorganismer ble deretter tilsatt.

### **Vannholdingskapasitet**

Mengde vann som tilsettes skal i henhold til standarden være mellom 40 og 60 % av jordens vannholdingskapasitet, og dette tilsvarer ofte ca 20 % av jordens tørrvekt. Stedegen jord, bioslam og elsorb har svært ulike egenskaper, blant annet når det gjelder innhold av organisk materiale, som er den bestanddelen som i stor grad binder vannet til jordpartiklene.

Testsubstrater og testsubstans vil derfor ha ulik vannholdingskapasitet, og dette vil påvirke blandingene ved at ulike mengder vann må tilsettes hver enkelt konsentrasjon for at forholdene skal ligge til rette for at testorganismene skal trives. I vurderingen av hvor mye vann som skulle tilsettes hvert replikat ble det derfor tatt utgangspunkt i å tilsette 20 % av blandingens tørrvekt. I tillegg ble det benyttet lupe for å kontrollere at en tynn film med vann dekket hver enkelt jordpartikkel. Dette ga jorden en fuktig konsistens uten at den hadde tendens til å være gjørmete.

### **Testmiljø**

Beholdere av hardplast, 650 mL (16,5 \* 11,5 \* 5 cm), ble benyttet til tester med planter og meitemark. Til spretthaler og enchytraeider ble det benyttet 10mL beholdere i hardplast med glatt innside og med lokk som kunne lukkes igjen. I eksponeringsperioden har planter og jordlevende organismer stått i fytotron med 20 °C, 16t: 8t lys/mørke og 75 % luftfuktighet.

## 2.2 Økotoxikologiske tester

Giftighetstester med jordlevende organismer ble utført i henhold til standarder fra ISO, og gjennomført med organismene raigras og rødkløver (ISO, 2002), meitemark (ISO, 1998), enchytraeider (ISO, 2002) og spretthaler (ISO, 1999). Giftighetstesting av bakterier ble gjennomført i henhold til en metode fra Microbics (<http://www.azurenv.com/mtox.htm>).

### 2.2.1 Karakterisering av testmaterialer

pH og ledningsevne (elektrolytisk konduktivitet) ble bestemt på jord, slam og elsorb (tabell 2.5). pH ble bestemt ved å tilsette destillert vann til substratet, til dette var helt dekket av væske. Blandingen ble satt på magnetrører i 5 minutter, og pH ble deretter målt ved bruk av et Orion pH-meter.

Ledningsevnen ble målt ved å tilsette destillert vann til substratet, til dette var helt dekket av væske. Blandingen ble satt på magnetrører ved 20 °C i 5 minutter, og målinger av elektrolytisk konduktivitet ble deretter gjennomført på filtrert porevann ved bruk av en ”1040 Pharmacia Conductivity Monitor”. Filtringen ble gjort ved å suge opp 1-2 mL i en engangssprøyte og deretter sprøyte ca 1 mL av løsningen inn i apparatet gjennom et 0.45 µM filter.

**Tabell 2.5. Målte verdier av pH og ledningsevne i stedegen jord, bioslam, behandlet bioslam og elsorb.**

Substrat	pH	Ledningsevne(mS/cm)
OECD-jord	6,0±0,5	----
Stedegen jord	7,4	0,46
Bioslam	6,8	2,07
Behandlet slam	7,9	19,47
Elsorb	6,6	81,35

### 2.2.2 Oversikt over gjennomførte tester

Tester med referansestoffer ble gjennomført for å undersøke følsomheten til frøstammene og kulturene som ble benyttet, og om referansestoffene hadde effekt på samtlige testorganismer innenfor følsomhetsområdene som er definert i standardene. Samtidig var tester med referansestoffer en egenkontroll på at testene ble utført riktig.

Testprogrammet for avfallstofferne (bioslam og elsorb) fra Essoraffineriet ble satt opp på tilsvarende måte som testoppsettet i standardene.

*Tabell 2.6. Utførte tester.*

Teststoff/ Testorganisme	Karbendazim	NaTA	Elsorb	Slam med 0,3 % elsorb	Slam med 0,6 % elsorb	Slam	Behandlet bioslam
<b>Raigras</b>		X	X	X	X		
<b>Rødkløver</b>		X	X	X	X	X	
<b>Meitemark</b>	X		X	X	X		
<b>Spretthaler</b>	X			X	X		
<b>Enchytraeider</b>	X			X	X		
<b>Microtox</b>			X	X	X	X	X

### 2.2.3 Tester

#### Testkonsentrasjoner

For testing av referansestoffer på planter anbefales det i standarden å benytte testkonsentrasjoner mellom 0 og 1000 mg NaTA per kg jord (tørrvekt). Det ble derfor valgt ut 6 testkonsentrasjoner innenfor dette området.

Ved testing av referansestoffer på meitemark skal man i henhold til standarden observere effekter på reproduksjon mellom 1 og 5 mg karbendazim tilsatt OECD-jord, og testkonsentrasjonene 0, 1, 2, 4 og 8 mg/kg jord (tørrvekt) er derfor valgt ut. For enchytraeider er lavere testkonsentrasjoner valgt ut (0, 0,5, 1, 2, 4 mg/kg), da disse er mer følsomme, og EC50 for reproduksjon var i henhold til standarden forventet å være 1,2 mg  $\pm$  0,8 mg karbendazim/kg jord (tørrvekt). Spretthaler ble eksponert for konsentrasjonene 0, 2, 4, 8, 16 og 32 mg karbendazim/kg jord (tørrvekt).



I samtlige tester med bioslam inneholdende 0,3 eller 0,6% elsorb er det benyttet 5 konsentrasjoner mellom 0 og 100 % innblanding av bioslam med elsorb i stedege jord (0, 10, 25, 50, 100). I microtox er bakteriene testet for giftigheten av ekstrakter av disse.

Toksisitet av elsorb ble undersøkt ved å bruke eksponeringskonsentrasjoner på 0, 0,3 , 0,6 , 2 og 10 % tilsatt stedege jord.

Rødkløver ble eksponert for bioslam isolert, og det ble da benyttet samme testkonsentrasjoner som for bioslam med elsorb (0, 10, 25, 50 og 100%).

### **Plantetester.**

Plantetester er utført med referansestoff (NaTA) i OECD-jord, og med bioslam og elsorb i stedege jord. Prøvene er opparbeidet etter beskrivelse i kapittel 2.1.7, og hvert replikat ble tilsatt 300 g jord (tørrvekt). Raigrasfrø ("Tove", Pf 857421) og rødkløverfrø ("Nordi", Pf 20138) fra Felleskjøpet (Ås, Norge) er benyttet i testene.

Før tilsetning til replikatene ble frøene nøye undersøkt, og misfargede eller skadede frø ble fjernet. 10 hele og fine frø ble tilsatt hvert replikat, og lett dekket med jord. Lokk med hull i ble lagt løst på toppen av hver beholder, for å redusere faren for uttørking ved stor fordampning av vann. Beholderne ble plassert i fytotron, og lokkene ble fjernet når frøene hadde begynt å spire. Spirene ble vannet hver dag, og en gang pr. uke ble de flyttet på, for å sørge for mest mulig like lysforhold. I løpet av de første 1 – 2 ukene ble replikatene tynnet ut, slik at de inneholdt totalt 5 spirer.

I henhold til standarden er eksponeringstiden definert til 3 uker, og en eksponeringstid på 20 dager er derfor benyttet til tester med NaTA i OECD-jord. I tester med bioslam med elsorb, elsorb isolert og bioslam isolert er derimot eksponeringstiden forlenget til 6 uker for å kunne observere eventuelle langtidseffekter av teststoffene.

Ved avslutning av testen ble antall spirer talt. Spirene i hvert replikat ble klippet over helt nede ved overgangen til jorden, og veid med finvekt.

## **Meitemark**

Tester med meitemark er utført med referansestoff (karbendazim) i OECD-jord og bioslam og elsorb i stedegen jord. Prøvene er opparbeidet etter beskrivelse i kapittel 2.1.7, og 500 g jord/jordblanding er tilsatt hvert replikat.

Voksne meitemark (med clitellum) av arten *Eisenia fetida* (Lumbricidae, Annelida), fra kultur dyrket på Blindern er benyttet. Dyrene ble lagt på vått filterpapir over natten for å tømme tarmen. Deretter ble dyrene veid, og vekten notert. 10 dyr ble tilsatt hvert replikat. Tørket hestemøkk ble benyttet som fôr, og før tilsetning ble det lagt i bløt i vann og deretter plassert oppå jorden. Beholderne med meitemark ble plassert i fytotron, og tapte vekt på replikatet ble en gang i uken erstattet med vann og hestemøkk.

Effekt på overlevelse, vekt og reproduksjon ble bestemt etter 4 uker. Som mål på reproduksjon ble antall produserte kokonger brukt. Ved forsøkets slutt ble de voksne meitemarkene plukket ut av beholderne, og lagt på vått filterpapir på petriskåler for å tømme tarmen over natten. Samtlige meitemark i hvert replikat ble deretter veid samlet. Jorden i hvert replikat ble nøye gjennomsoekt for å finne alle kokonger. Antall kokonger i hvert replikat ble notert, i tillegg til vekt og overlevelse av voksne dyr.

## **Microtox**

Apparatet som er benyttet i testen er ”Microtox 500 toxicity test system”. Testsystemet leveres som en ferdig pakke med apparatur, reagenser og programpakke for PC.

Analyseapparatet er et temperaturkontrollert fotometer som holder 15°C. Det er selvkalibrerende og måler lysutsendelse fra bakteriene ved tid 0 og etter ett eller flere tidsintervall. Toksisk effekt av eksponering for ulike forbindelser måles som hemming i luminescens sammenlignet med en kontroll, og EC50-verdi og 95% konfidensintervall bestemmes ut fra dose-responskurven til testsubstratet.

Bakterier fra stammen *Vibrio fischeri* (B-11177) ble benyttet i testene. Vi fikk bakterier fra Jordforsk, og disse ble dyrket, frosset ned og rekonstituert på Blindern. Løsning med 2 % NaCl ble brukt som kontrolløsning.

Ekstrakter av bioslam og elsorb ble opparbeidet ved å følge en to-trinns prosedyre (van Gestel et al., 2000). Prosedyren gikk i første trinn ut på at “ultrapure water” ble tilsatt blandinger

med jord, bioslam og elsorb, opp til tilnærmet vannholdingskapasitet. Løsning med 0,001M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ble tilsatt i 1:2 forhold til jordblandingen. Prøvene ble satt på risting i 6 timer, og sedimenterte deretter i 45-60 min. Væsken ble sugd opp og sentrifugert på 1000g i 30 min. Hver prøve ble filtrert i 5 mL engangssprøyter med filter. 3 mL av dette ble tilsatt rør som sto kjølig over natten.

Trinn to besto i at det resterende sedimentet fra første trinn ble tilsatt tilsvarende mengde 0,001M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  og satt på risting i 18 timer  $\pm$  20 min. Prøvene ble deretter satt til å sedimentere i 45-60 min. Væsken ble sugd opp, sentrifugert på 1000g i 30 min, og filtrert ved hjelp av 5 mL engangssprøyter med filter.

Eluatet fra første og andre trinn ble blandet i 1:1 forhold, og 2 % NaCl ble tilsatt. Denne løsningen ble testet med Microtox.

PC-programmet regnet ut EC50, og det ble laget figurer i Microsoft Excel, ut fra bakterienes lysutsendelse.

### **Spretthaler**

*Folsomia candida* (Isotomidae, Collembola) fra to ulike kulturer er benyttet, på grunn av lav overlevelse og reproduksjonsrate blant dyrene. Det ble gjennomført totalt fire spretthaletester, og dyr fra en kultur dyrket på Blindern ble benyttet i den første testen. Etter at denne testen ble forkastet på grunn av høy dødelighet i kontrollgruppene, ble det benyttet *F. candida* fra en kultur dyrket på Jordforsk. Også test nummer to måtte forkastes av samme grunn som den første. I de to første testene ble karbendazim benyttet som teststoff, og i tredje forsøk ble det bestemt å gå over til å undersøke toksisiteten av bioslam og elsorb. Resultatene ble svært variable, også i kontrollgruppene. Før fjerde forsøk med *F. candida* ble jord og bioslam frosset ned på  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i en uke, for å drepe eventuelle soppsporer som kunne ha negativ effekt på spretthalene. Denne testen var innenfor standardens krav til variabilitet når det gjaldt overlevelse, mens resultatene for reproduksjon var svært variable. Det ble etter dette besluttet å gå bort fra *F. candida* som testorganisme.

Testene ble utført med voksne, synkroniserte spretthaler (*F. candida*), og 10 dyr ble tilsatt hvert replikat etter å ha blitt sugd opp med slange. Tørrgjær ble brukt som fôr, og tilsatt en

gang i uken, i tillegg til tapt vekt i vann. Beholderne med spretthaler ble plassert i fytotron under eksponering.

Effekt på overlevelse og reproduksjon ble bestemt etter eksponering i 3 uker, i henhold til standarden. Mål på reproduksjon skulle være antall juvenile. Forsøket ble avsluttet ved å tilsette vann til godt over jordløsningen. En spatel ble brukt til å røre først forsiktig, og deretter kraftig. Dyrene fløt opp, og de ble talt etter tilsetning av etanol. Der tettheten på dyrene var stor, ble dyrene talt i porsjoner ved bruk av en spatel med innrisset rutemønster.

### **Enchytraeus**

*Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Annelida) som er benyttet i testene er dyrket på petriskåler med bacto-agar, og kommer fra to ulike kulturer. To tester med referansestoffet karbendazim i OECD-jord ble gjennomført med *E. crypticus*. Dyrene som ble benyttet i den første testen kom fra en kultur dyrket på Blindern, men testen kunne ikke godkjennes i henhold til krav i standarden, da dødeligheten var stor i kontrollgruppene og reproduksjonen var svært variabel. Dyrene som ble benyttet i test nummer to kom fra en kultur dyrket på Jordforsk, men resultatene viste tilnærmet samme resultater som i den første testen. Det ble derfor gått bort fra å bruke *E. crypticus* videre som testorganisme.

Prøver ble opparbeidet etter beskrivelse i kapittel 2.1.7. Kokt, tørket og knust havregryn ble brukt som fôr, og en spatelspiss ble tilsatt på toppen av jorden etter at dyrene hadde fordelt seg i replikatet.. Alle begre ble veid, og vekten notert på lokket. Beholderne med enchytraeider ble plassert i fytotron, og havregryn og tapt vekt i vann ble tilsatt en gang i uken. Effekt på overlevelse og reproduksjon ble bestemt etter eksponering i 3 uker, i henhold til standarden. Mål på reproduksjon skulle være antall juvenile.

Forsøket ble avsluttet ved å tilsette vann til over jordløsningen. Lokket ble satt godt på beholderne, som ble ristet kraftig i ca 30 sekunder. Replikatenes ble satt kjølig for å sedimentere. Etter ett døgn hadde jord- og slammassene sunket ned mot bunn, mens enchytraeidene lå øverst. Væsken ble sugd bort, og dyrene ble forsiktig sugd opp med pipette og lagt på petriskåler med innrisset rutemønster. Der tettheten på dyr var stor, ble dyrene talt rutevis. Antall voksne og juvenile ble notert.

#### **2.2.4 Statistikk**

Beregninger av NOEC og LOEC er gjort ved bruk av ANOVA (analysis of variance). Denne metoden regner ut sannsynligheten for at verdiene i de ulike behandlingene er fra samme statistiske populasjon. Når sannsynligheten er veldig liten, er gruppene signifikant forskjellige. I resultatene i denne undersøkelsen er en grense på 5 % sannsynlighet ( $p\text{-verdi} < 0,05$ ) benyttet.

For å kontrollere varianshomogenitet ble Levene's test benyttet. Denne metoden tester om variansen mellom replikater av en behandling er like stor/liten som variansen i de andre behandlingene, noe som er en forutsetning for ANOVA. I tilfeller hvor det ikke var varianshomogenitet ble dataene transformert. Dersom p-verdien fra Levene's test var mindre enn 0,05 måtte dataene transformeres. For enkelte av resultatene i undersøkelsen var variansen mellom de ulike behandlingene svært forskjellig, noe som skyldtes liten varians mellom spesielt kontrollene, og stor varians mellom replikatene der organismene begynte å reagere på behandlingen. I noen av disse tilfellene gav heller ikke velkjente metoder for transformasjon homogen varians, og det var ikke mulig å gjennomføre ANOVA og påfølgende Dunnett's t-test.

Enveis ANOVA sammenligner alle replikatene i en behandling med alle replikatene i hver av de andre behandlingene, og regner ut sannsynligheten for om de kommer fra samme behandling eller ikke. En p-verdi under 0,05 tilsier at behandlingen har gitt signifikant forskjellige resultater, og dermed har en effekt.

Dunnetts t-test sammenligner alle replikatene fra en behandling, med kontrollen. Den høyeste dosen som i følge Dunnetts t-test ikke er signifikant forskjellig fra kontrollen er verdien for NOEC. Den laveste dosen som i følge testen er signifikant forskjellig fra kontrollen er verdien for LOEC.

For beregning av EC50, EC10 og LC50 er programmet ICp (Norberg-King, 1993) benyttet.

## 3.0 Resultater

### 3.1 Testing med referansesubstanser

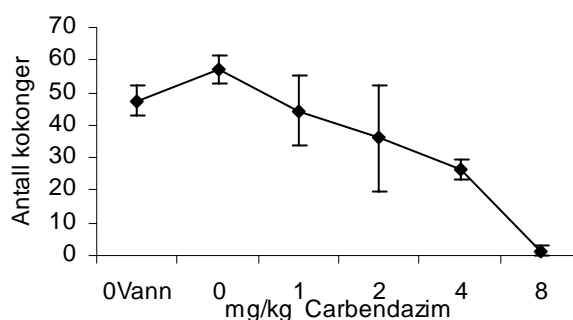
Tester med referansesubstanser er utført for å kontrollere om følsomheten til den kulturen av testorganismer som benyttes er i samsvar med det som er funnet for tidligere testede kulturer. Resultater fra en giftighetstest med et referansestoff skal enten ligge innenfor et område definert i standarden, eller oppgis som en referanse på kulturens følsomhet når resultatet fra testing av andre stoffer rapporteres.

#### 3.1.1 Meitemark

For at meitemarktester skal være godkjent i henhold til standarden må kontrollreplikaten oppfylle følgende krav: produksjonsraten av juvenile må være minst 30 i hver beholder, variasjonskoeffisienten (standardavviket delt på gjennomsnittet) for reproduksjon må ikke overgå 30 %, og prosentvis dødelighet blant voksne må være  $\leq 10$  %. Den utførte testen med karbendazim oppfyller disse kravene. Reproduksjon var det mest følsomme endepunktet, med en signifikant effekt observert ved en konsentrasjon på 4 mg/kg (fig. 3.1.1). Beregnede LC/EC 50, EC10 og NOEC verdier fra testen er vist i tabell 3.1.

Tabell 3.1. Testresultater for *E. fetida* eksponert for karbendazim.

Endepunkt	Estimater (mg/kg) med 95% konfidensintervall		
	Overlevelse	Vektendring	Reproduksjon
NOEC	8	4	2
LOEC	>8	8	4
LC50 / EC50	>8	1,9 (1,1-7,1)	4,1 (0,6-4,6)
EC10	-	1,2 (0,7-1,7)	0,67 (0,1-2,0)
P-verdi	0,0732	<0,0001	0,0001



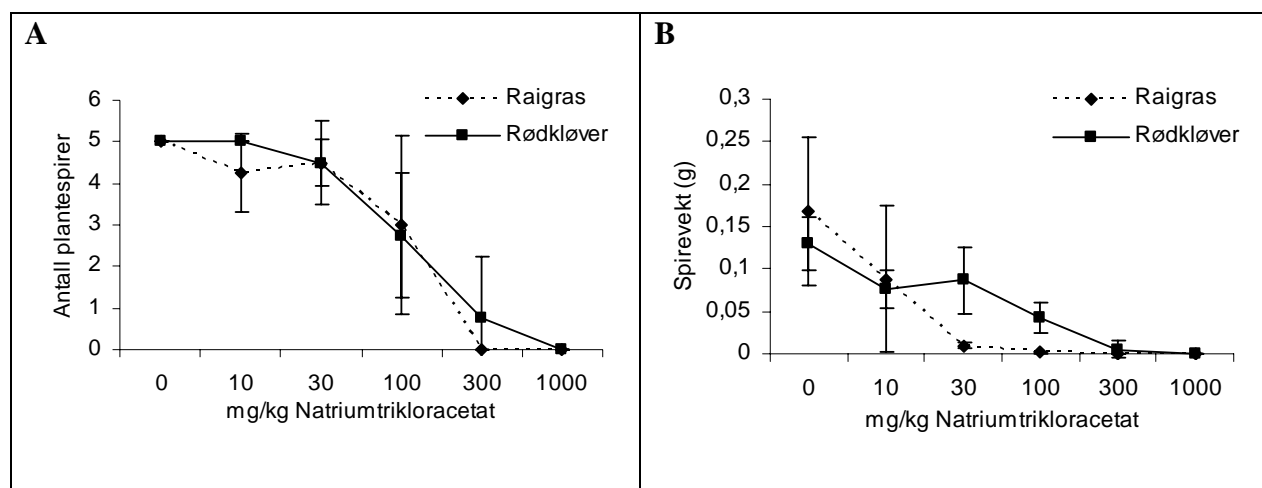
Figur 3.1.1. Produksjon av kokonger (gjennomsnitt  $\pm$  std) hos *Eisenia fetida* eksponert for karbendazim.

### 3.1.2 Raigras og Rødkløver

For at plantetester skal være godkjent i henhold til standarden, må det være 5 friske spirer i hver kontrollbeholder ved testens slutt. Dette kravet ble oppfylt, og den utførte testen er derfor godkjent i henhold til kravene i standarden. Både raigras og rødkløver hadde enkelte overlevende spirer i konsentrasjoner med natriumtrikloracetat opp til 100 mg/kg tørr jord. Rødkløver var mest følsom når det gjaldt overlevelse (siring), og hadde derfor en noe lavere LC50-verdi enn raigras. Når det gjaldt hemming i vekst, var derimot raigras mest følsom med en lavere LOEC og betraktelig lavere EC50 verdi (tabell 3.2).

**Tabell 3.2. Oppsummering av testresultater for *L. perenne* (raigras) og *T. pratense* (rødkløver) eksponert for natriumtrikloracetat.**

Endepunkt	Estimater for giftighet (mg/kg) med 95% konfidensintervall			
	Overlevelse (siring)		Vekt	
	<i>L. perenne</i>	<i>T. pratense</i>	<i>L. perenne</i>	<i>T. pratense</i>
NOEC	30	30	10	30
LOEC	100	100	30	100
LC50 / EC50	133 (35–217)	125 (54–245)	9,4 (3,8–27)	48 (0–75)
EC10	-	-	1,9 (0,8 – 18)	2,6 (1,6–11)
P-verdi	<0,0001	<0,0001	0,0007	<0,0001



Figur 3.1.2. *T. pratense* (rødkløver) og *L. perenne* (raigras) eksponert for ulike konsentrasjoner natriumtrikloracetat. A) Overlevelse (gjennomsnitt ± std, B) Spirevekt (gjennomsnitt ± std.).

## 3.2 Testing av avfallsprodukter fra Slagentangen

### 3.2.1 Bioslam iblandet 0,3 og 0,6% elsorb

#### Meitemark (*E. fetida*)

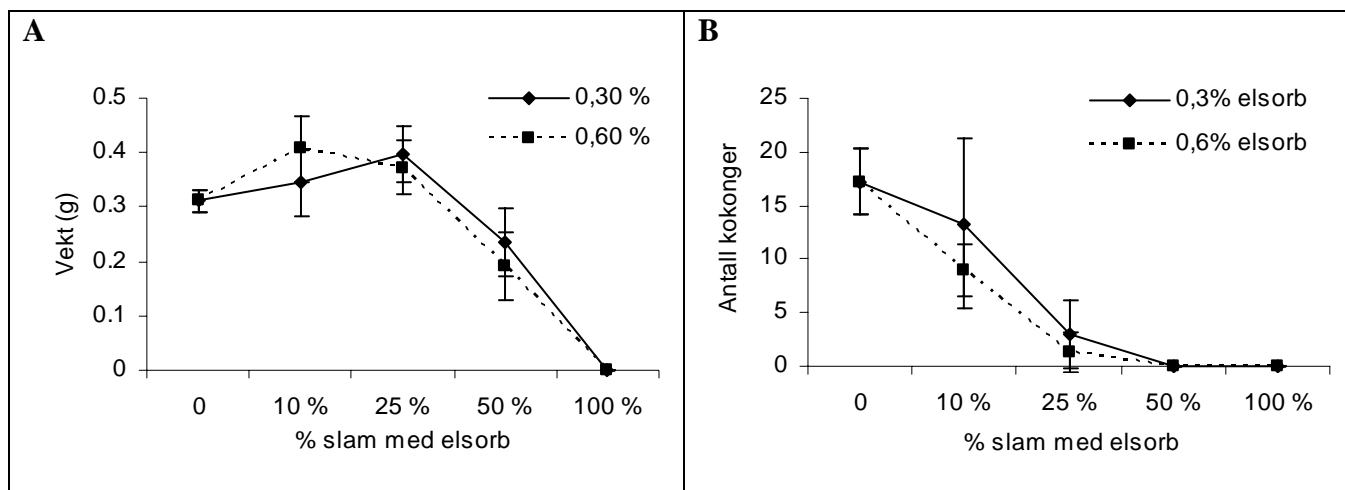
For at denne testen skal være godkjent i henhold til standarden stilles tilsvarende krav som beskrevet i kapittel 3.1.1. Resultatene viste en dødelighet på <1% blant adulte i kontrollgruppene, variasjonskoeffisienten for reproduksjon var på henholdsvis 22 og 18 % for seriene 0,3 og 0,6%, mens gjennomsnittlig kokongproduksjon var 17,3 for begge serier. Det er sannsynlig at 17 kokonger gir klekking av 30 juvenile (Astrid Lofs-Holmin, 1985), og testen er derfor godkjent i henhold til standarden. For begge serier (0,3 og 0,6%) var reproduksjon det mest følsomme endepunktet (tabell 3.3). Figur 3.2.1 viser først en vektøkning hos dyrene, før denne synker, mens reproduksjonen synker gradvis fra allerede laveste konsentrasjon.

**Tabell 3.3. Oppsummering av testresultater fra tester med *Eisenia fetida* eksponert for bioslam med 0,3 og 0,6 % elsorb. Alle verdier er oppført i prosent slam med elsorb blandet inn i jord.**

Endepunkt	Giftighetsestimater (% slam) med 95% konfidensintervall					
	Overlevelse		Vektendring		Reproduksjon	
	0,3 %	0,6 %	0,3 %	0,6 %	0,3 %	0,6 %
<b>NOEC</b>	25	25	10 *	25	**	-
<b>LOEC</b>	50	50	25 *	50	**	10
<b>LC50 / EC50</b>	41 (35–51)	41 (10–72)	38 (37–37)	31 (9,4–41)	17 (5,3–22)	11 (6,8–16)
<b>EC10</b>	-	-	28 (27–27)	14 (10–35)	4,3 (0–16)	2,1 (1,5–4,1)
<b>P-verdi</b>	0,001	0,001	0,001	0,0043	**	0,001

\* De lave verdiene for NOEC og LOEC skyldes positiv effekt på dyrenes vekt. En signifikant negativ effekt kan observeres ved 50 % tilsetning av bioslam med elsorb (figur 3.2.2). \*\* Det var ikke mulig å beregne NOEC, LOEC og p-verdi ved ANOVA, da varianshomogenitet ved transformasjon ikke kunne oppnås. Fra fig. 3.2.1 sees en tydelig effekt allerede ved bruk av 10 %, men bruk av 10 % som LOEC kan ikke bekreftes med ANOVA.





Figur 3.2.1. *Eisenia fetida* eksponert for ulike konsentrasjoner av bioslam med elisorb innblandet i stedege jord.

A) Vektendring (gjennomsnitt  $\pm$  std), B) Reproduksjon (gjennomsnitt  $\pm$  std).

### Raigras og rødkløver

Også denne testen var godkjent i henhold til standarden. Testsubstratene gav en signifikant effekt både på overlevelse og vekt (tabell 3.4). Når det gjaldt overlevelse var effekten signifikant negativ, ved at færre frø spiret der de høyeste konsentrasjonene ble tilsatt, mens for vekt var effekten signifikant positiv (fig. 3.2.2).

Tabell 3.4. Oppsummerende testresultater fra tester med *L. perenne* (raigras) eksponert for bioslam med 0,3 og 0,6 % elisorb.

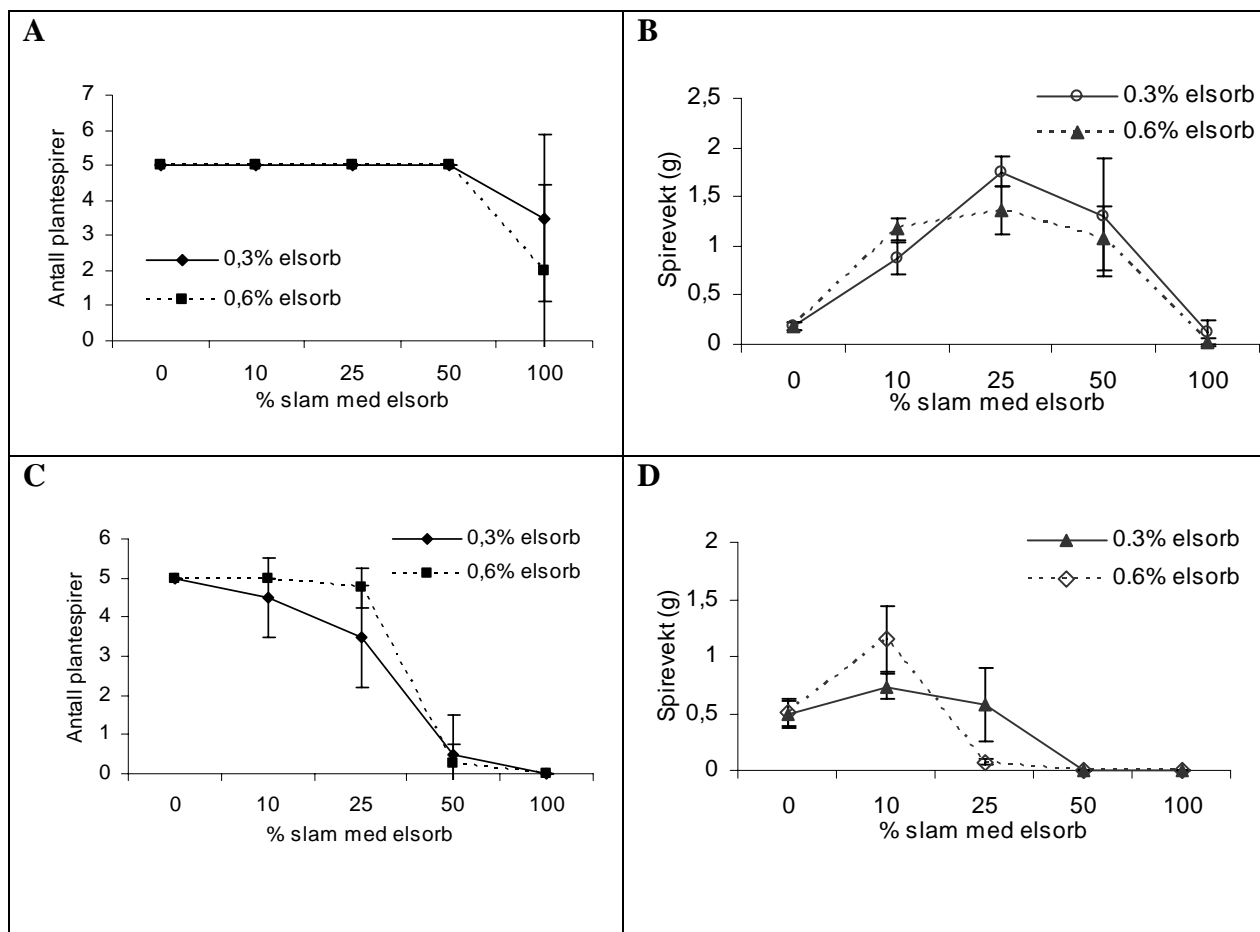
Endepunkt	Estimater for giftighet (prosent slam med elisorb) med 95% konfidensintervall				
	Overlevelse (spiring)			Vektendring	
	0,3 %	0,6 %	0,6% korrigert	0,3 %	0,6 %
NOEC	50	100	100	0	0
LOEC	100	>100	>100	10 *	10*
LC50 / EC50	>100 (-)	90 (-)	92 (-)	78 (72-84)	75 ** (74-77)
EC10	-	-	-	55 * (40-56)	55 ** (54-55)
P-verdi	0,2286	0,0619	0,0632	0,001	0,001

\* Verdiene skyldes positiv effekt, da spirene har hatt en signifikant vekstøkning ved tilsetning av bioslam og elisorb opp til 25 %. Det ble observert en nedgang i ved slamtilsetning > 50 %, men dette var ikke signifikant relatert til kontrollgruppene. \*\* Ett replikat skilte seg ut ved at ingen av frøene hadde spiret, noe som sannsynligvis skyldes at frø ikke ble tilsatt. Verdiene for EC50 var allikevel like  $\pm$  0,01 % både der alle replikater var med, og der det ene som skilte seg ut var med. Det samme gjaldt for EC10.

Bioslam med elsorb hadde en positiv effekt på raigras opp til 50 % tilsetning. Raigrasspirene som ble dyrket i serien med 0,6 % elsorb hadde en kraftigere positiv effekt enn spirene i serien med 0,3 % elsorb. Vilåårene for spiring ble svekket ved en konsentrasjon på 100% (fig. 3.2.2). Rødkløver var mer følsom enn raigras, og vekt var det mest følsomme endepunktet (tabell 3.5). Ved innblanding av 0,6% elsorb hadde bioslam med elsorb en positiv effekt på rødkløverspirenes vekt ved lave konsentrasjoner (10%), mens negativ effekt kunne observeres ved en konsentrasjon på 25%. Serien med 0,3% elsorb gav ingen signifikant positiv effekt på spirenes vekt, mens negativ effekt ble observert ved en konsentrasjon på 50% (fig. 3.2.2). EC50 var lavere for 0,6% enn for 0,3% elsorb innblandet (tabell 3.5).

**Tabell 3.5. Oppsummerende testresultater for vekt fra test med T. pratense (rødkløver) eksponert for bioslam med 0,3 og 0,6 % elsorb.**

Endepunkt	Estimer for giftighet (prosent slam med elsorb) med 95% konfidensintervall			
	Overlevelse (spiring)		Vekt	
	0,3 %	0,6 %	0,3 %	0,6 %
<b>NOEC</b>	25	25	25	0
<b>LOEC</b>	50	50	50	10
<b>LC50 / EC50</b>	33 (20-42)	37 (35-41)	30 (18-40)	18 (18-18)
<b>EC10</b>	-	-	14 (11-33)	11 (11-11)
<b>P-verdi</b>	0,001	0,001	0,001	0,001

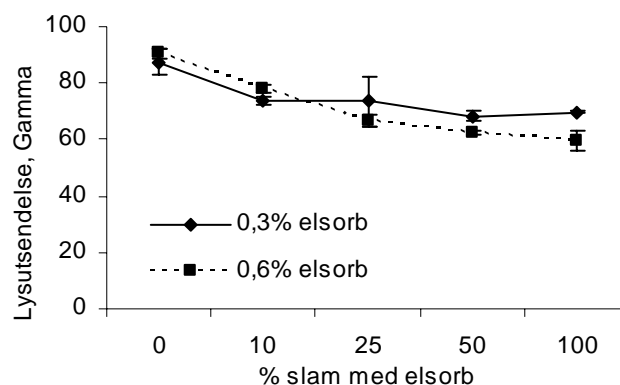


Figur 3.2.2. *L. perenne* (raigras) og *Trifolium pratense* (rødkløver) eksponert for ulike konsentrasjoner slam og elisorb (0,3% og 0,6%) i stedege jord. A) Overlevelse for raigras (gjennomsnitt  $\pm$  std), B) Vekt pr. plantespire for raigras (gjennomsnitt  $\pm$  std), C) Overlevelse for rødkløver (gjennomsnitt  $\pm$  std), D) Vekt pr. plantespire for rødkløver (gjennomsnitt  $\pm$  std).

## Microtox

Ekstrakter fra jord tilsatt bioslam med 0,3 og 0,6 % elisorb gav en svak (40 % i høyeste konsentrasjon), men signifikant negativ effekt på bakterier, målt med Microtox. LC50 var henholdsvis 141 (139-154) og 155 (85-282) for seriene med 0,3 og 0,6% elisorb (høyere enn høyeste tilsatte konsentrasjon).

Figur 3.2.3 viser en gradvis nedgang i luminescens relatert til økende konsentrasjon bioslam og elisorb. Nedgangen er noe større for bakteriene eksponert for serien 0,6 % enn hos bakteriene eksponert for serien 0,3 %.



Figur 3.2.3. Endring i bioluminescens (gjennomsnitt  $\pm$  std) hos *Vibrio fischeri* (B-11177) relatert til konsentrasjon bioslam med elisorb.

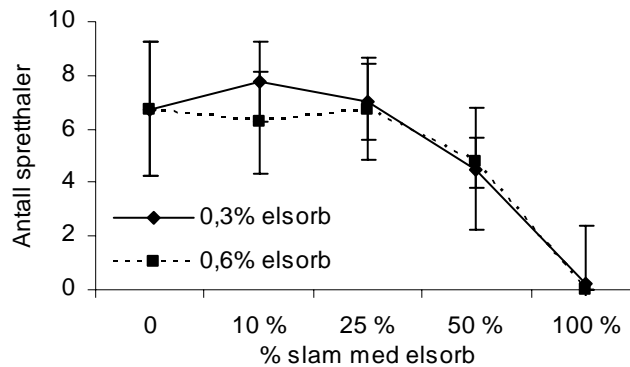
### Spretthaler (*F. candida*)

For at testen skulle være godkjent i henhold til standarden var det forventet at dødeligheten blant adulte i kontrollgruppene ikke overgikk 20 %, reproduksjonsraten var minimum 100 juvenile per kontrollbeholder, og variasjonskoeffisienten for reproduksjon skulle ikke være over 30 %. I den utførte testen var dødeligheten gjennomsnittlig på 33% for adulte i kontrollgruppene, reproduksjonsraten var gjennomsnittlig på 56,5 og variasjonskoeffisienten på 100%. Testen var derfor ikke tilfredsstillende i henhold til krav i standarden, og resultatene må tolkes med forsiktighet.

Overlevelsen blant spretthalene varierte lite mellom de to seriene (0,3 og 0,6 % elisorb) (fig. 3.2.4), og signifikant nedgang kunne observeres ved konsentrasjon på 100 % (tabell 3.7).

**Tabell 3.7. Oppsummerende testresultater fra tester for overlevelse hos spretthaler (*F. candida*).**

Endepunkt	Giftighetsestimater (% slam) med 95% konfidensintervall	
	Slam med 0,3 % elisorb	Slam med 0,6 % elisorb
NOEC	50	50
LOEC	100	100
LC50	60 (32–76)	64 (41–75)
P-verdi	<0,0001	0,0002



Figur 3.2.4. Overlevelse hos *F. candida* (gjennomsnitt  $\pm$  std) eksponert for ulike doser av slam og elisorb.

### 3.2.2 Elsorb

#### Meitemark (*E. fetida*)

For at denne testen skulle være godkjent i henhold til standarden ble det stilt tilsvarende krav som beskrevet i kapittel 3.1.1. Resultatene viste en dødelighet på 0 % blant adulte i kontrollgruppene, men ingen av dyrene hadde reproducert seg. Mangel på reproduksjon gjør derfor at denne testen ikke er tilfredsstillende i henhold til krav i standarden, og resultatene må tolkes med forsiktighet.

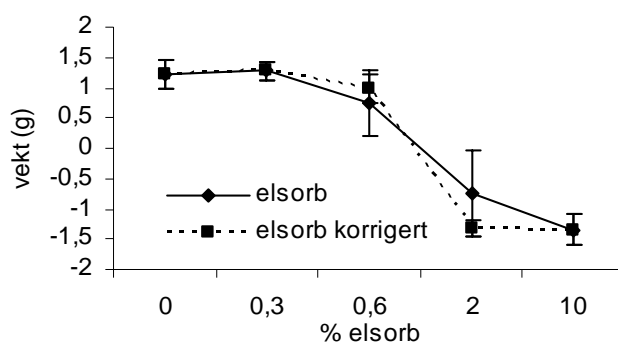
Elsorb alene hadde en signifikant effekt på både overlevelse og endring i vekt ved relativt lave konsentrasjoner, og NOEC og LOEC var betraktelig lavere enn ved tilsvarende eksponering for blanding av bioslam og elisorb (tabell 3.8). Data som kunne leses direkte ut av forsøket ble plottet i kurven "elsorb", mens kurven for korrigerte data ble plottet i "elsorb korrigert". I det korrigerte datasettet er ett replikat i konsentrasjonen med 0,6 % elisorb fjernet, da det ikke var mulig å finne noen dyr her. Dette skyldes sannsynligvis at dyr ikke ble tilsatt. Der konsentrasjonen var på 2 % elisorb ble to av replikatene fjernet da samtlige mark her hadde overlevd ved å oppholde seg i maten.

Tabell 3.8. Oppsummering av testresultater fra test med *E. fetida* eksponert for elsorb.

Endepunkt	Giftighetsestimerer (% slam) med 95% konfidensintervall				
	Overlevelse		Vektendring		Reproduksjon ***
	Avleste data	Korrigerte data**	Avleste data	Korrigerte data**	
NOEC	2	0,6	0,6	0,6	-
LOEC	10	2	2	2	-
LC50/EC50	1,9	1,3 (1,3-1,3)	1,1 (0,6-1,4)	1,1 (0,7-1,4)	-
EC10	-	-	0,4 (0,1-0,9)	0,5 (0,1-0,9)	-
P-verdi	0,0440	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-

\* Denne verdien var det ikke mulig å regne ut. \*\* Samtlige mark i to av replikatene som inneholdt 2 % elsorb overlevde ved å oppholde seg i maten, i tillegg til at det ikke fantes noen mark i ett av replikatene med 0,6 % elsorb. "Overlevelse korrigert" er analyser utført etter at antall overlevende mark er satt til 0 i konsentrasjonen 2 %, i tillegg til at det ene som skilte seg ut i konsentrasjonen 0,6 % er fjernet. De korrigerte verdiene gir en lavere NOEC og LOEC enn de ukorrigerte, noe som også gjelder for LC50. \*\*\* Dyrene hadde ikke reproduisert seg i noen av replikatene.

I det korrigerte datasettet (figur 3.2.5) observeres en gradvis nedgang i vekt hos dyrene fra 0,3 % tilsetning av elsorb. Reduksjonen i vekt er signifikant ved konsentrasjon på 2 %, noe som gjelder både for korrigerte og ukorrigerte data (tabell 3.8).



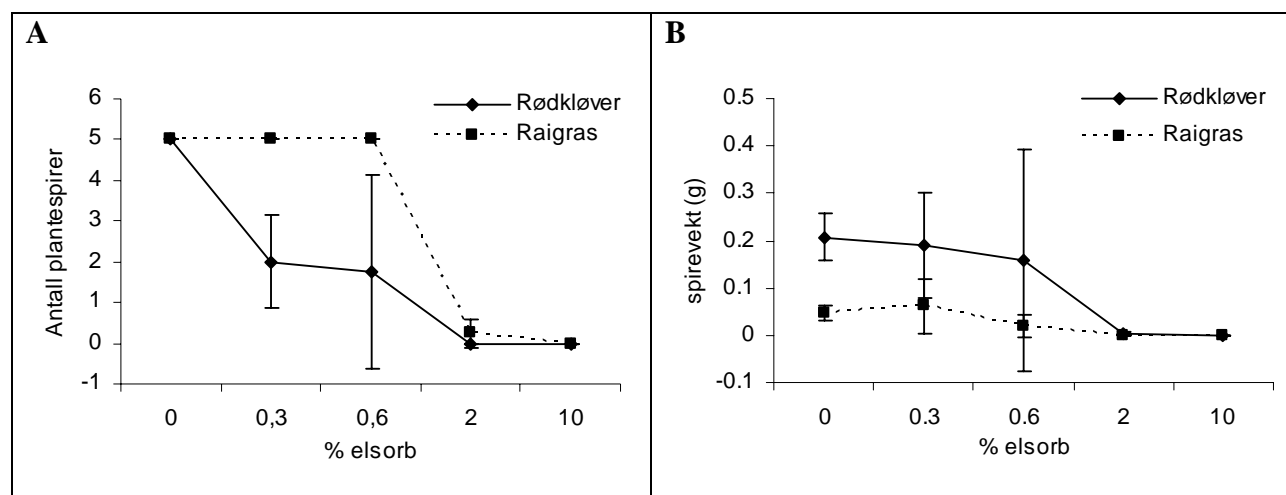
Figur 3.2.5. Vektendring pr. replikat (gjennomsnitt  $\pm$  std) hos *E. fetida* eksponert for ulike konsentrasjoner av elsorb.

## Raigras og rødkløver

Fem friske spirer var tilstede i hver kontrollbeholder, og testen var derfor godkjent i henhold til standarden. Raigras og rødkløver hadde en signifikant respons både i forhold til overlevelse og vekt ved eksponering for elsorb (tabell 3.9). Rødkløver var noe mer følsom enn raigras både når det gjaldt overlevelse og vekt (fig. 3.2.6).

Tabell 3.9. Oppsummering av testresultater for test med *L. perenne* (raigras) eksponert for elsorb.

Endepunkt	Giftighetsestimater (% slam) med 95% konfidensintervall			
	Overlevelse (spiring)		Vekt	
	<i>L. perenne</i>	<i>T. pratense</i>	<i>L. perenne</i>	<i>T. pratense</i>
NOEC	0,6	0	0,3	0,3
LOEC	2	0,3	0,6	0,6
LC50/EC50	1,3 (1,3-1,4)	0,4 (0,3-0,4)	1,1 (0,6-1,3)	0,5 (0,3-0,5)
EC10	-	-	0,3 (0,1-0,8)	0,3 (0-0,3)
P-verdi	0,001	0,001	0,001	0,0069



Figur 3.2.6. *T. pratense* (rødkløver) og *L. perenne* (raigras) eksponert for ulike konsentrasjoner elsorb i stedege jord. A) Overlevelse (gjennomsnitt ± std) hos *T. pratense* og *L. perenne*, B) Vekt pr. plantespire (gjennomsnitt ± std) for *L. perenne* og *T. pratense*.

## Microtox

Elsorb ble også testet med Microtox, men for lav utsendelse av lys hos bakteriene i disse testene førte til at testen ikke kunne benyttes som et mål på toksisitet av dette stoffet overfor bakterier.

### 3.2.3 Behandlet og ubehandlet bioslam

Toksisitet av bioslam alene ble testet på rødkløver og med Microtox. Bioslam som er behandlet etter metoden beskrevet i kapittel 1.3 ble kun testet med Microtox.

#### Rødkløver (*T. pratense*)

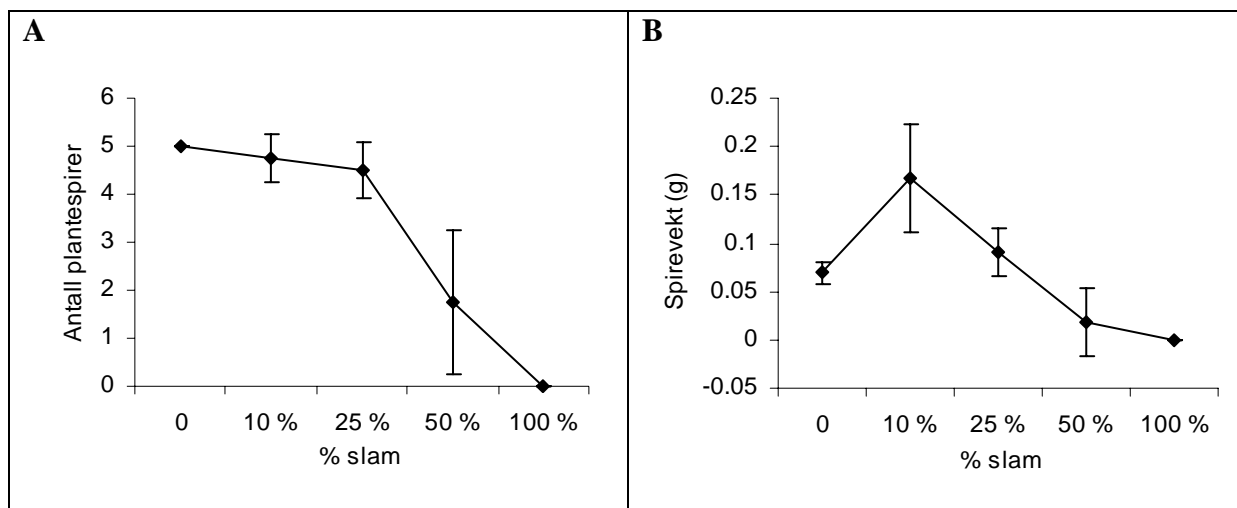
Fem friske spirer var tilstede i samtlige kontrollbeholdere, og testen er derfor godkjent i henhold til standarden. Rødkløver spiret i jord med opp til 25 % tilsetning av bioslam. Spirehyppigheten var signifikant redusert ved 50 % tilsetning (tabell 3.10).

*Tabell 3.10. Oppsummering av testresultater fra test med T. pratense (rødkløver) eksponert for bioslam.*

Endepunkt	Estimer for giftighet (prosent slam med elsorb) med 95% konfidensintervall	
	Overlevelse (spiring)	Vekt
NOEC	25	50
LOEC	50	100
LC50/EC50	43 (32-67)	34 (19-48)
EC10	-	16 (12-35)
P-verdi	0,0012	0,0029

Lave konsentrasjoner (opp til 25 %) hadde liten innvirkning på rødkløverens evne til å spire, mens 50 % tilsetning reduserte overlevelsen signifikant. Ved 100 % tilsatt slam var ikke forholdene for spiring tilstede, men bioslam hadde en svak positiv effekt på veksten hos rødkløver ved en konsentrasjon på 10 % (fig. 3.2.7). Denne økningen var ikke signifikant (tabell 3.10).



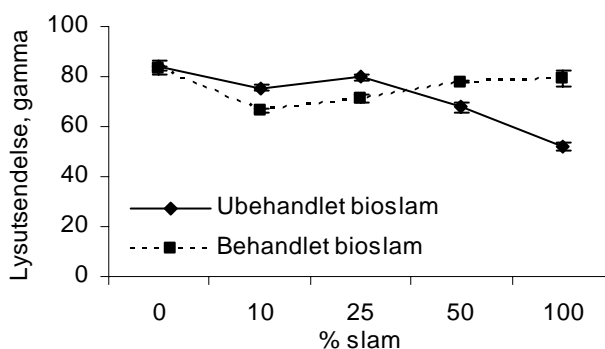


Figur 3.2.7. *T. pratense* (rødkløver) eksponert for ulike konsentrasjoner bioslam i stedegen jord.

A) Overlevelse (gjennomsnitt  $\pm$  std), B) Vekt (gjennomsnitt  $\pm$  std).

### Microtox

Bioslam med behandling så ikke ut til å ha noen effekt på bakterienes utsendelse av lys, mens bioslam som ikke hadde gjennomgått noen form for behandling førte til en reduksjon i bakterienes lysutsendelse (fig. 3.2.8). Dette kan være en indikasjon på at behandlet bioslam (utråtnet slam) har en lavere toksisitet overfor bakteriene enn det ubehandlet slam har.



Figur 3.2.8. Bioluminescens (gjennomsnitt  $\pm$  std) hos *Vibrio fisheri* (B-11177) som følge av økende konsentrasjon ubehandlet og behandlet bioslam.

### 3.2.4 Oppsummering av testresultater for planter

Raigras hadde størst vektøkning som følge av tilførsel av 25% bioslam med 0,3% elsorb. 0,6% elsorb gav også stor vektøkning for denne plantearten. Rødkløver var mer følsom, men hadde allikevel en klar vektøkning ved tilførsel av 10% i begge serier. Slam alene gav også en tydelig positiv effekt ved lave konsentrasjoner. Negativ effekt ble observert hos rødkløver fra 25% tilsetning (tabell 3.11).

**Tabell 3.11. Oppsummering av prosentvis endring i vekst hos raigras (L. perenne) og rødkløver (T. pratense) relatert til konsentrasjon bioslam med innblanding av elsorb.**

Konsentrasjon	Raigras			Rødkløver		
	0,3%elsorb	0,6%elsorb	slam	0,3%elsorb	0,6%elsorb	slam
10 %	+ 362	+ 520	*	+ 48	+ 129	+ 142
25 %	+ 830	+ 619	*	+ 16	- 86	+ 30
50 %	+ 586	+ 475	*	- 98	- 100	- 73
100 %	- 39	- 85	*	- 100	- 100	- 100

\* Ikke testet

## 4.0 Diskusjon

I kombinasjon inneholder bioslam og elsorb nitrogen, fosfor og svovel i mengdeforhold som kan utnyttes av planter, i tillegg til at produktene tilfredsstiller krav til minsteinnhold av sekundær- og mikronæringsstoffer for å kunne benyttes som jordforbedringsmiddel (basert på krav i Norsk Lovtidend, 2003). Produktene har derfor i henhold til departementenes regelverk et gjødslingspotensiale, og med tanke på at jorden rundt raffineriet er skrinnet, er det sannsynlig at tilførsel av lave konsentrasjoner av bioslam med elsorb til jorden kan bidra med store deler av den næringen som vegetasjonen har behov for.

De biologiske testene som er utført i denne undersøkelsen viser at både raigras og rødkløver får forbedret vekst ved tilførsel av begrensede mengder bioslam med elsorb. Andre undersøkelser (Sæbø et al., 2005, Sæbø et al., 2002 og Stabnikova, 2005) har vist tilsvarende resultater ved tilførsel av slam fra renseanlegg til grøntarealer. I de tidligere studiene viste det seg at slam alene ikke ga positive effekter, mens slam blandet med kompost eller jord ga øket plantevekst, forbedring av jordens struktur og en mer gunstig sammensetning av næringsstoffer i jorden.

Samtidig er det et problem at mange slamtyper inneholder forurensende stoffer som kan ha et akkumuleringspotensiale i næringskjeden eller gi negative effekter på andre trofiske nivå, til tross for at de viser seg å ha positive effekter på vegetasjon når det blandes inn i begrenset omfang, (Sæbø et al., 2002, Miljø- og Energiministeriet Miljøstyrelsen, 1996). Det er dette de økotoksikologiske testene skal gi en indikasjon på. Kort oppsummert viste testene at plantene oppnådde en forbedret vekst ved lave doser bioslam med elsorb, mens bakteriene (*V. fischerii*) hadde en gradvis nedgang i aktivitet parallelt med økende dose bioslam med elsorb. Meitemark viste ingen negativ respons på tilsetning av bioslam med elsorb opp til 25 % når det gjaldt overlevelse og vektendring, mens reproduksjonen ble redusert allerede ved laveste dose.

Når man tester komplekse blandinger slik som i dette tilfellet, med bioslam og elsorb, kan det være vanskelig å tolke resultatene med hensyn til hvilke komponenter i produktene som er utslagsgivende for observerte toksiske effekter. En tilnærming som gir noe informasjon om dette, er å sammenligne innhold av de enkelte forurensningene i bioslam og elsorb med

publiserte terskelverdier for effekter på jordlevende organismer. Jeg har valgt å basere dette på normverdier for forurensset grunn offentliggjort av Statens forurensningstilsyn (SFT). Normverdier er en betegnelse som angir grenseverdier som i seg selv ikke er bindende, men som brukes av forurensningsmyndighetene i vurderinger av et område eller en lokalitets anvendelsesmuligheter. SFT's normverdier bygger på beregninger av hvilken mengde av en miljøgift som jordlevende organismer kan eksponeres for uten at negative effekter oppstår, og toleransedosen er basert på tilgjengelig økotoksikologisk informasjon for ulike stoffer (SFT, 1999). Normverdiene uttrykkes som PNEC (Predicted No Effect Concentration), og sammenlignes med målte konsentrasjoner av disse stoffene i miljøet, uttrykt som PEC (Predicted Environmental Concentration). I mitt tilfelle er PEC-verdier hentet fra de kjemiske analysene som er utført for bioslam og elisorb. Dersom forholdet PEC/PNEC er lavere enn 1 er risikoen akseptabel, mens PEC/PNEC større enn 1 innebærer at grenseverdien er overskredet og utslippet er forbundet med uakseptabel risiko (European Commission, 1996).

En viktig begrensning ved bruk av normverdier som de definert av SFT, er at de er beregnet for enkeltstoffer, og ikke komplekse stoffblandinger som er det vi finner i de to produktene som er testet i denne undersøkelsen. De ulike forurensingene i en stoffblanding kan virke additivt, antagonistisk eller synergistisk på hverandre. En additiv effekt er resultat av kjemikalier som virker sammen, og der effekten tilsvare summen av kjemikalienes selvstendige virkning. Antagonistisk effekt oppstår derimot når kjemikalier motvirker hverandre, og en eksponering for kjemikalier som påvirker hverandre på denne måten gir mindre effekt enn summen av det enkelte kjemikaliets selvstendige effekt. Synergi er et fenomen der toksisiteten av en blanding av kjemikalier er større enn man forventer ut fra den totale toksisiteten til hvert enkelt kjemikalie som er tilstede i blandingen (Van Leeuwen og Hermens, 2004).

De kjemiske analysene av bioslam viser at innholdet av tungmetaller, BTEX (Benzen, Toluen, Etylbenzen, Xylen),  $\Sigma$ PAH og PCB er under SFT's normverdier. Innholdet av alifater (fraksjon C12-C35) er målt til 1230 mg/kg TS, og dette overstiger normverdien på 100 mg/kg som er definert av SFT (SFT, 1999). De høye verdiene i bioslam skyldes rester av olje, og det er velkjent at slike forbindelsene har et potensiale til å virke toksisk på jordlevende organismer.

En av de kjemiske analysene som er utført viser også at innholdet av PAH-forbindelsene naftalen, fluoren, pyren og fenantren er høyere enn SFT's normverdier (SFT, 1999), til tross for at  $\Sigma$ PAH er lav. Negative effekter som observeres i de biologiske testene kan derfor også skyldes tilstedeværelse av enkelte PAH-forbindelser.

Kjemiske analyser av elsub viser et lavt innhold av tungmetaller (under SFT's norm), og det er ikke funnet andre miljøgifter i dette produktet. Høye konsentrasjoner av salter, spesielt natrium, setter derimot begrensninger for bruken av dette produktet i terrestrisk miljø. Dette skyldes at jordlevende organismer i større eller mindre grad er følsomme overfor høyt saltnivå (Andersen et al., 2000).

PAH-forbindelsene som er tilstede i bioslam fra Essoraffineriet vil, sammen med andre forurensende stoffer, kunne transporteres inn i plantens rhizosfære (planterøtter og den delen av jorden og mikroorganismer som påvirkes av røttene) (Harvey et al., 2002). Planten tilfører i utgangspunktet oksygen og næringsstoffer til det mikrobielle samfunnet, mens mikroorganismene har en gunstig innvirkning på plantens vekst og utbredelse. Denne balansen forstyrres blant annet av PAH'er fordi mikroorganismene bryter ned de aromatiske hydrokarbonene og utnytter karbonskjelettene til egen cellevekst og reproduksjon. Den mikrobielle nedbrytningen fører til at lavere konsentrasjoner PAH trekkes inn i plantens sirkulasjonssystem. Planten har også en hydrofil barriere i røttene som hindrer opptak av hydrofobe forbindelser. Dette gjør at PAH-forbindelser med fire eller flere ringer i liten grad tas opp fra porevannet.

Der de mikrobielle prosessene i plantens rhizosfære er redusert vil endel forbindelser tas opp av planten. Her er det sannsynlig at noe blir metabolisert, men undersøkelser viser også at plantens vekst reduseres og nivået av oksidativt stress øker når planten får høy konsentrasjon av blant annet PAH-forbindelser (Harvey et al., 2002). Det er derfor en mulighet for at deler av de negative effektene som observeres på planter ved innblanding av høye konsentrasjoner bioslam i denne undersøkelsen, kan tilskrives nærvær av PAH-forbindelser. Dette er også vist i tidligere undersøkelser (Sverdrup et al., 2003), der negativ effekt på vekst og spiring hos rødkløver og raigras oppstår ved lavere konsentrasjoner enn det som er tilstede i bioslam fra Essoraffineriet. Forholdet mellom PEC/PNEC for de PAH-forbindelsene som i størst grad er tilstede i bioslam antyder at konsentrasjonen av disse stoffene er høy relatert til hva som anses som akseptabel risiko forbundet med utslipp i høye konsentrasjoner (tabell 4.1)

**Tabell 4.1 PEC/PNEC for PAH-forbindelser i bioslam. Alle verdier er oppgitt i mg/kg tørrvekt.**

Forbindelse	PNEC	PEC	PEC/PNEC
<b>ΣPAH</b>	19,7	5,55**	0,28
<b>Fluoren</b>	0,57	1,99*	3,49
<b>Naftalen</b>	0,8	1,69*	2,11
<b>Fenantren</b>	***	1,38*	-
<b>Pyren</b>	0,1	0,16*	1,6
<b>Benzo(a)pyren</b>	1,5	0,14*	0,09

\* Tall fra kjemisk analyse utført av LabNett, 2004.

\*\* Gjennomsnitt av analyse utført av Jordforsk, 2001 og LabNett, 2004 (tabell 1).

\*\*\* Ikke definert i SFT, 1999.

Meitemark responderer negativt på PAH i jord, men tåler relativt høye konsentrasjoner av forbindelsene. LC50-verdier har i tidligere undersøkelser vist seg å være ved konsentrasjoner på 155 mg/kg (pyren), 134 mg/kg (fenantren) og 69 mg/kg (fluoren) (Sverdrup et al., 2002). Spretthaler (*Folsomia fimetaria*) og enchytraeider (*Enchytraeus crypticus*) har noe høyere følsomhet enn meitemark (*Eisenia veneta*) (Sverdrup et al. 2002). Med utgangspunkt i disse resultatene er det nærliggende å tolke testresultatene fra denne undersøkelsen slik at den negative effekten som observeres hos dyrene ikke kommer fra PAH-forbindelser. Dosene dyrene er eksponert for her er betraktelig lavere enn både LC50 og NOEC-verdiene som uttrykkes i tidligere undersøkelser (Sverdrup, 2002).

Samtidig kan toksisiteten av PAH'er påvirkes av flere utenforstående faktorer. Ulike oljeprodukter øker forbindelsenes biotilgjengelighet parallelt med økende konsentrasjon olje (Bogan et al., 2005). Dette fører til at det oppstår en additiv effekt. Fototoksitet av PAH'er overfor planter har også blitt påvist (Ren et al., 1996). Dette innebærer at PAH absorberer UV-A og UV-B lys, noe som resulterer i at toksisiteten overfor plantene øker.

Innholdet av olje (alifater, fraksjon C12-C35) er høyt i bioslam fra Essoraffineriet, og PEC/PNEC – forholdet gir en klar indikasjon på at nivået er høyt relatert til hva som anses som akseptabel risiko forbundet med spredning (tabell 4.2)

**Tabell 4.2 PEC/PNEC for innhold av olje i bioslam. Alle verdier er oppgitt i mg/kg tørrvekt.**

Forbindelse	PNEC	PEC	PEC/PNEC
<b>C5-C10</b>	50	10	0,2
<b>C10-C12</b>	100	10	0,1
<b>C12-C35</b>	100	6600*	66

\* Gjennomsnitt av de tre kjemiske analysene som er foretatt (tabell 2.1).

Utgangspunktet for normverdiene for alifatiske hydrokarbonfraksjoner og tilsetningsstoffer til oljer er forslag til normverdier fra Naturvårdsverket og Svenska Petroleumsinstitutet (SFT, 1999).

Rødkløver som er eksponert for bioslam i denne undersøkelsen har ingen signifikant nedgang i spiring inntil 25% tilsetning av bioslam. Dette blandingsforholdet mellom jord og bioslam tilsvarer et innhold av 308 mg olje/kg tørrvekt, noe som er betraktelig høyere enn grenseverdien fastsatt av SFT (100 mg/kg). Vekt er et mindre følsomt endepunkt. Plantene ser altså ut til å trives til tross for høyt innhold av alifater.

I de utførte testene med bioslam med elsorb er raigras mindre følsom overfor eksponering enn rødkløver (tabell 3.4 og 3.5), og for serien 0,3% observeres ingen signifikant negativ effekt på vekt hos raigras, som følge av innblanding av bioslam med elsorb, selv ikke ved høyeste konsentrasjon (100%). Den positive effekten er derimot stor, og det er tydelig at plantene har tatt opp og utnyttet næringsstoffene som er tilstede i avfallsproduktene. Engelsk raigras (*Lolium perenne*) har i tidligere undersøkelser vist seg å være spesielt effektiv i bioremediering av oljekontaminert jord (Kirk et al., 2005). Det ble i denne studien påvist signifikant øket antall heterotrofe bakterier i rhizosfæren til raigras som vokste i kontaminert jord relatert til kontrolljord. Den katabolske aktiviteten til disse bakteriene fører til at hydrokarbonene brytes ned, og nedbrytningen skjer raskere når antall bakterier er høyt. Samhandlingen mellom planten og den mikrobielle aktiviteten vil ha en positiv innvirkning på nedbrytningen av oljerester. Den tofrøbladede arten (alfalfa) som ble testet i studien (Kirk et al., 2005) ga ikke signifikant økning i antall heterotrofe bakterier, og en tilsvarende positiv effekt oppsto ikke. Lavere konsentrasjon av de forurensende stoffene vil være tilgjengelig for opptak der den mikrobielle aktiviteten er høy, og det er derfor nærliggende å tenke seg at disse prosessene kan påvirke artenes toleranse overfor eksponering av oljerester i jord.

En annen studie (Banks et al., 2003) konkluderer i likhet med Kirk et al., 2005, at nedbrytingen av hydrokarboner går raskere på områder der det har vært plantet ut ulike gressarter relatert til områder uten vegetasjon, samtidig som det argumenteres for at "aging" sannsynligvis er den prosessen som bidrar til den største nedbrytningen. "Aging" innebærer at dynamiske fysiske og kjemiske prosesser får organiske forurensende stoffer til å diffundere dypere inn i jordens mikroporestruktur, eller transporteres gjennom den faste fasen ved fast-fase diffusjon. Dette fører til at jordstrukturen legger beslag på deler av de skadelige organiske forbindelsene, og gjør disse mindre biotilgjengelige (National Institute of Environmental Health Sciences, 1998). Med bakgrunn i tidligere studier er det med andre ord sannsynlig at den allerede eksisterende vegetasjonen rundt Essoraffineriet på Slagentangen vil ha et potensiale for å bidra til en viss grad av naturlig bioremediering av oljerester ved en eventuell spredning. Meitemark vil også kunne bidra i disse prosessene, da studier har vist at veksten hos planter er forbedret i områder der meitemark (*Eisenia fetida*) er tilført sammenlignet med områder uten meitemark (Callahan et al., 2002).

Normverdier for saltholdighet er ikke angitt i SFT's normverdier (SFT, 1999), og det var derfor ikke mulig å beregne PEC/PNEC for natriumklorid. En stor del av de negative effektene som observeres på vekt og reproduksjon hos meitemark i denne undersøkelsen kan imidlertid tillegges det høye innholdet av natrium i elisorb (tabell 2.2), da disse dyrene er følsomme overfor høye saltnivåer. Astrid Lofs-Holmin (1985), skriver at *E. fetida* har en toleransegrense på 0,5% NaCl for å opprettholde optimale forhold for vekst og reproduksjon. Dette samsvarer med en annen undersøkelse, som kan vise til at utviklingen av kokonger synker ved tilsetning av mer enn 0,5% NaCl, og EC50 er beregnet til 1,9 g/kg (Addison, 2002). Samtidig viser Kerr et al (2003) at kokongproduksjon finner sted i prøver med opptil 3 g NaCl/kg, men undersøkelsen sier ingenting om antall kokonger i behandlingene. Det kan derfor bare antas at antall kokonger er lavere der konsentrasjonen av NaCl er høy (3g/kg) sammenlignet med kontrollene. Den høyeste testkonsentrasjonen i denne undersøkelsen var 15 g NaCl/kg jord, og det ble ikke observert noen nedgang i overlevelse i denne behandlingen. Dette kan tyde på at dyrene aktiverer andre metabolske prosesser ved dårligere levevilkår, sammenlignet med tilfeller der forholdene er optimale. Denne antagelsen styrkes av en studie av Fisher et al. (1996) der det bl.a. kommer frem at *E. fetida* som eksponeres for de høyeste konsentrasjonene (80 mM) NaCl har størst reduksjon i kokongproduksjon, samtidig som disse har størst vektøkning relatert til dyr i replikater med lavere konsentrasjoner NaCl.



Tilsvarende resultater kommer frem i denne oppgaven, i testen som er utført med *E. fetida* eksponert for bioslam med 0,3% elsorb. I figur 3.2.1 observeres en vektøkning hos dyrene ved opp til 25% tilsetning av bioslam med elsorb, samtidig som det kommer frem at produksjonen av kokonger synker parallelt med dette. Fisher et al. (1996) viste også at dyr som hadde sluttet å reprodusere i de høyeste konsentrasjonene, gjenvant sin normale reproduksjonskapasitet når de ble flyttet til substrat uten NaCl, noe som innebar at nedreguleringen av reproduksjonen var reversibel.

Andersen et al. (2000) observerte en signifikant negativ effekt på reproduksjon hos spretthaler og meitemark som følge av salt i veistøv, samtidig som bakteriene testet med Microtox åpenbart reagerte på andre substanser i veistøvet. Antydning til tilsvarende resultater kan observeres i testene med bioslam og elsorb i denne undersøkelsen, da størst negativ effekt på meitemark oppstod der saltkonsentrasjonen var høyest. Samtidig ble det observert en negativ effekt på microtox-bakteriene, men det er usikkert hva toksisiteten skyldes. I spiretestene med bioslam med elsorb oppstod også størst negativ effekt i prøvene med høyest saltholdighet, noe som samsvarer med resultater i tidligere undersøkelser (Andersen et al., 2000, Renault et al., 1998, Robidoux, 1999), da disse også har funnet at plantenes spiring reduseres ved høye konsentrasjoner med NaCl (natriumklorid),  $\text{NaSO}_4^{2-}$  (natriumsulfat), og NaFo (natriumformiat).

## **4.1 Slam som jordforbedring**

Retningslinjene for bruk av slam er definert i ”Forskrift om gjødselvarer mv. av organisk opphav” (Norsk Lovtidend, 2003), og forvaltningsinstans er Mattilsynet. Tidligere erfaringer har vist at ulike slamprodukter er godt egnet til mange ulike formål, og en rapport har vist til en rekke vellykkede prosjekter ved innblanding av slam i jordmasser. Områder dette har vært utprøvd på, er offentlige parkanlegg, veiskråninger og rabatter, støyvoller og trafikkisikringstiltak, grøntarealer rundt boligområder, idrettsanlegg (fotballbaner, alpinanlegg, hoppbakker, golfbaner) og revegetering (Sæbø et al., 2005). Visse krav stilles derimot til slammet som benyttes til disse formålene, blant annet må slammet være stabilisert og hygienisert i tillegg til at det må blandes med jord på forhånd, eller moldes ned umiddelbart etter spredning. Slammet skal ikke medføre fare for spredning av sykdomssmitte til mennesker, dyr og planter, og skal ikke forårsake luktulemper eller andre miljøproblemer ved lagring og bruk. Avløpsslam må derfor gjennomgå ulike typer behandling før det kan brukes (Norsk Lovtidend, 2003), og utråtningsprosessen på slam, som er under utvikling ved raffineriet på Slagentangen, kan derfor være ett av flere nødvendige ledd før spredning av dette slamproduktet kan finne sted.

I denne undersøkelsen er en prøve med behandlet (utråtnet) bioslam testet og sammenlignet med ubehandlet bioslam, med Microtox. Bakteriene responderer ikke negativt på utråtnet slam, mens nedgang i bioluminescens er tydelig ved eksponering for ubehandlet bioslam (fig. 3.2.8). Dette kan være en indikasjon på at utråtnet slam er mindre toksisk enn ubehandlet slam, samtidig som dette kun er testet på ett trofisk nivå. I og med at bakterier kan reagere på andre substanser enn det som er tilfelle for planter og invertebrater, kan man ikke ut fra denne ene testen si noe om hvilken betydning endring i slamblanding vil ha på økosystem-nivå.

Blandingsavfall som bioslam og elsorb inneholder flere typer forurensende stoffer, og det er derfor vanskelig å konstatere hvilken effekt som stammer fra de komponentene produktene består av. De ulike komponentene kan dessuten påvirke effekten av hverandre ved å øke eller redusere mobilitet, biotilgjengelighet, opptak og biotransformasjon hos testorganismene.

## 5.0 Konklusjon

Jorden rundt raffineriområdet inneholder i utgangspunktet lite næringsstoffer og gir dårlige vekst- og levevilkår for planter og jordlevende dyr. Tilsetning av lave doser bioslam med elsorb har i denne undersøkelsen vist seg å gi en kraftig vekstøkning hos planter, i størst grad hos raigras (opptil 830 %), men også hos rødkløver (opptil 129 %). Testene viste imidlertid at rødkløver oppnådde den største vekstforbedringen ved tilførsel av bioslam alene. Dette kan skyldes det høye innholdet av salt (natriumklorid) i elsorb.

Ved tilførsel av 10 % bioslam med 0,3 % elsorb ble det observert en reduksjon i reproduksjonen hos meitemark på 23 %. I og med at jordlevende invertebrater er svært følsomme overfor salt, er det en mulighet for at deler av de negative virkningene på disse dyrene kommer av natriuminholdet i elsorb-produktet. Terrestriske organismer har generelt en lav toleranse overfor salt, og elsorb er derfor lite egnet til bruk i disse miljøene. En alternativ kilde til fosfor, svovel og mikronæringsstoffer bør derfor vurderes.

En spredning av 10 % innblanding av slam og en alternativ gjødselkilde i forhold til antatt mengde stedegen jord kan sannsynligvis anbefales som jordforbedringsmiddel. Med bakgrunn i tidligere studier som er diskutert i denne oppgaven er det også sannsynlig at planter, dyr og bakterier sammen vil ha en positiv innvirkning på hverandre, noe som vil redusere skadelige effekter av spesielt oljerester som er tilstede i bioslam.

Bakteriene som er testet i Microtox reagerte negativt ved at lysutsendelsen ble hemmet (opptil 35 %), men EC50-verdien var svært høy (>100 %). Dette skyldes andre mekanismer enn skadevirkningene hos planter og dyr, da bakteriene er marine og har høy toleranse overfor de høye saltnivåene. Avrenninger som inneholder høye nivåer av næringssalter som bl.a. fosfor bør derimot unngås for å hindre skadelige algeoppblomstringer. Toksisiteten kan allikevel karakteriseres som lav, og basert på resultatene med Microtox er det ikke grunnlag for å anta at spredning mot sjøen vil ha skadelige effekter på økosystemet.

## 6.0 Referanser

Addison, J.A. (2002). Derivation of matrix soil standards for salt under the British Columbia contaminated sites regulation, Addendum C: Soil invertebrate toxicity tests: Lessons and recommendations. Rapport fra Royal Roads University: 22 sider.

Andersen, S., Amundsen, C.A., Hartnik, T., Linjordet, R., Nordal, O., Warner, B., Krogh, P.H. (2000). Kjemisk og økotoksikologisk karakterisering av veistøv. Rapport nr. 84/99 fra Jordforsk og Danmarks Miljøundersøkelser. 60 sider.

Azur environmental. Microtox® Rapid Toxicity Testing System, Manual. Online, [www.azurenv.com](http://www.azurenv.com)

Banks M.K., Schwab P., Liu B., Kulakow P.A., Smith J.S., Kim R. (2003). The effect of plants on the degradation and toxicity of petroleum contaminants in soil: a field assessment. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology* **78**: 75-96.

Bogan B.W., Beardsley K.E., Sullivan W.R., Hayes T.D., Soni B.K. (2005). Effect of volatile hydrocarbon fractions on mobility and earthworm uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and soil/lampblack mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**: 181-9.

Bøen, A., Haraldsen, T.K. og Sørheim, R.. (2005). Muligheter for bruk av avfallsbasert biorest fra anaerob biologisk behandling. Rapport fra Jordforsk. 23 sider.

Callaham, M.A..Jr, Stewart, A.J., Alarcon, C., McMillen, S.J. (2002). Effects of earthworm (*Eisenia fetida*) and wheat (*Triticum aestivum*) straw additions on selected properties of petroleum-contaminated soils. *Environmental Toxicology and chemistry* **21**: 1658-63.

Central New York's Near-Real-Time Surface Water Quality network. Oppdatert 15/06-05. Online, [http://www.ourlake.org/preview/html/specific\\_conductivity.html](http://www.ourlake.org/preview/html/specific_conductivity.html)

Essoraffineriet, Slagentangen. (1991). Elsorb – Norskutviklet prosess for rensing av SO<sub>2</sub>. Intern rapport fra Eссорaffineriet, Slagentangen. 12 sider.

Essoraffineriet, Slagentangen. (2000). Driftsinstruks, vannbehandling, kapittel 3. Intern rapport fra Eссорaffineriet, Slagentangen. 35 sider.

European Commission. 1996. Technical Guidance Document in Support of Commission directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Part II - Environmental Risk Assessment. Technical Report. Rapport fra European Commission, Luxembourg. 273 sider.

Fisher, E., Molnár, L. (1996). Growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) in semi-natural soil containing various metal chlorides. *Soil biology and biochemistry* **29**: 667:670.

Harkey, G.A. og Young, T.M. (2000). Effect of soil contaminant method in determining toxicity using the Microtox® assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**: 276–282.

Harvey P.J., Campanella B.F., Castro P.M., Harms H., Lichtfouse E., Schaffner A.R., Smrcek S., Werck-Reichhart D. (2002). Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental science and pollution research international* **9**: 29-47

ISO. 2002. Soil quality - Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.)- Determination of effects on reproduction and survival. ISO method 16387. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO. 1999. Soil quality-Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. ISO method 11267. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO. 1998. Soil quality-Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction. ISO method 11268-2. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO. 2002. Soil quality - Effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. ISO method 11269-2. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO. 2003. Soil quality - Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials. ISO method 15799. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Johnson, B.T. og Long, E.R. (1998). Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: A new tandem in vitro testing approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**: 1099-1106.

Kerr, M., Stewart, A.J. (2003). Tolerance test of *Eisenia fetida* for sodium chloride. *Journal of undergraduate research*, office of science, US Department of Energy, volume 3. Online, [www.scied.science.doe.gov/scied/JUR\\_v3/pdfs/Kerr\\_Stewart.pdf](http://www.scied.science.doe.gov/scied/JUR_v3/pdfs/Kerr_Stewart.pdf)

Kirk J.L., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. (2005). The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental pollution* **133**: 455-65.

Lin T.C og Chao M.R. (2002). Assessing the influence of methanol-containing additive on biological characteristics of diesel exhaust emissions using microtox and mutatox assays. *Science of the Total Environment* **284**: 61-74.

Lofs-Holmin, A. (1985). Vermiculture; present knowledge of the art of earthworm farming – a summary of recent literature. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Ecology and Environmental Research. Rapport 20, Uppsala, Sverige, 1985. ISBN 91-576-2263-9

Ma, W.C., van Kleunen, A, Immerzeel, J. og de Maagd, P.G.J.. (1998). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by earthworms: Assessment of equilibrium partitioning theory in in situ studies and water experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **17**: 1730-1737.

Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C. (1992). Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Polynuclear aromatic hydrocarbons, polychlorinated dioxins and dibenzofurans. Lewis publishers, Chelsea, Michigan, USA.

Miljø- og Energiministeriet Miljøstyrelsen (1996). Anvendelse af affaldsprodukter til jordbrugsformål. Miljøprojekt nr. 328. Rapport fra Miljø- og Energiministeriet Miljøstyrelsen. 165 sider.

National Institute of Environmental Health Sciences. 1998. Research brief 33: the effect of contaminant aging in soils on bioavailability. Oppdatert 02/11-04, Online, [http://www-apps.niehs.nih.gov/sbrp/researchbriefs/view.cfm?Brief\\_ID=33](http://www-apps.niehs.nih.gov/sbrp/researchbriefs/view.cfm?Brief_ID=33)

Norberg-King, T.J. (1993). A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (ICp) approach. (Version 2.0). National Effluent Toxicity Assessment Center. Duluth, Minnesota, USA.

Norsk Lovtidend (2003). Forskrift om gjødselvarer mv. av organisk opphav. Avd. 1, hefte 11, Kunngjort 18.07.2003

Peijnenburg, Willie J.G.M., Baerselman, Rob, de Groot, A.C., Jager, T., Posthuma, L., Van Veen, R.P.M. (1999). Relating environmental availability to bioavailability: Soil-type-dependent metal accumulation in the oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **44**: 294–310.

Qadir, M., Oster, J.D. (2003). Crop and irrigation management strategies for saline-sodic soils and waters aimed at environmentally sustainable agriculture. *Science of the Total Environment*. **323**: 1-19.

OECD (1984). Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD Guidelines for Testing of Chemicals 207. Paris, France.

- Ren L., Zeiler L.F., Dixon D.G., Greenberg B.M. (1996). Photoinduced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus* (Canola) during germination and early seedling development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **33**: 73-80.
- Renault, S., Lait, C., Zwiazek, J.J., MacKinnon, M. (1998). Effect of high salinity tailings waters produced from gypsum treatment of oil sands tailings on plants of the boreal forest. *Environmental Pollution*. **102**: 177-184.
- Robidoux, P.Y., Delisle, C.E. (1999). Ecotoxicological evaluation of three deicers (NaCl, NaFo, CMA)-Effect on terrestrial organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **48**: 128-139.
- Schnizler, M., Krumm, S., Clauss, W. (2002). Annelid epithelia as models for electrogenic Na<sup>+</sup> transport. *Biochimica et biophysica acta* **1566**(1-2): 84-91.
- SFT (1999). Veiledning om risikovurdering av forurenset grunn. Rapport nr. 98-089, Prosjekt: O-96010. ISBN-nr: 82-7655-159-9. TA-nr: 1629/99. Rapport fra Statens forurensningstilsyn. 103 sider.
- SFT (1999). Eksempelsamling for veiledning om risikovurdering av forurenset grunn. ISBN nr: 82-7655-169-6. TA-nr: 1648/99. Rapport fra Statens forurensningstilsyn. 46 sider.
- Sharer, M., Park, J.H., Voice, T.C., Boyd, S.A. (2003). Aging effects on the sorption-desorption characteristics of anthropogenic organic compounds in soil. *Journal of Environmental Quality* **32**: 1385-92.
- Stabnikova, O., Goh, W.-K., Ding, H.-B., Tay, J.-H., Wang, J.-Y. (2005). The use of sewage sludge and horticultural waste to develop artificial soil for plant cultivation in Singapore. *Bioresource Technology* **96**: 1073-1080.
- Sverdrup, L.E., Krogh, P.H., Nielsen, T, Kjær, C., Stenersen, J. (2003). Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere* **58**: 993 – 1003.



Sverdrup L.E., Krogh P.H., Nielsen T., Stenersen J. (2002). Relative sensitivity of three terrestrial invertebrate tests to polycyclic aromatic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **21**: 1927-33.

Sæbø, A., Amundsen, C.E., Bævre, O.A. (2002). Bruk av store mengder slam til spesielt formål. Planteforsk Særheim forskningssenter, Jordforsk, Planteforsk Kvithamar forskningssenter. Grønn forskning 10/2002. Rapport fra Planteforsk: 54 sider.

Sæbø, A., Asdal, Å., Fløistad, I.S., Hanslin, H.M., Haraldsen, T.K., Netland, J., Sjørsen, H. og Pedersen, P.A.. (2005). Slam og kompost til grøntanlegg. Rapport fra Planteforsk, Jordforsk og Universitetet for og miljø- og biovitenskap. 26 sider.

van Gestel, C.A.M., van der Waarde, J. J., Derksen, J.G.M., van der Hoek, E. E., Veul, M.F.X.W, Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg R. og Stokman G.N.M. (2001). The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 1438-1449.

Yara (2004/05). Gjødselhåndbok. Rapport fra Yara Norge. 80 sider

van Gestel, C.A.M og Hensbergen, P.J. (1997). Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **16**: 1177-1186.

van Leeuwen, C.J, Hermens, J.L.M.. (2004). Risk assessment of chemicals: An introduction, kapittel 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.